SHENGMING KEXUE YU GONGCHENG GAILUN

生命科学与工程概论

高晓蓉 李文利 主编

化学工业出版社

SHENGMING KEXUE YU GONGCHENG GAILUN

生命科学与工程概论

ISBN 978-7-122-00091-0

9 787122 000910 >

www.cip.com.cn

销售分类建议：生物
生命科学

定价：16.00元

生命科学与工程概论

高晓蓉　李文利　主编

化学工业出版社

·北京·

生命科学发展迅速，已成为21世纪初的主导科学，而且也影响、融合到许多工科专业，对非生物学专业的学生来说，了解生命科学的知识非常必要。本书在介绍基础知识的基础上，概述了相关生命科学工程技术原理及应用与发展，希望可帮助大学生了解生命科学知识，促进不同学科领域知识的交叉融合，发展创新思维。

本书可供非生物学专业的学生选修，也可供生命科学生物工程学生及相关人员参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学与工程概论/高晓蓉，李文利主编．—北京：化学工业出版社，2007.3
ISBN 978-7-122-00091-0

Ⅰ.生… Ⅱ.①高…②李… Ⅲ.生命科学-概论 Ⅳ.Q1-0

中国版本图书馆CIP数据核字（2007）第030550号

责任编辑：陈　丽　袁海燕　　文字编辑：刘砚哲
责任校对：李　林　　装帧设计：韩　飞

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街13号　邮政编码100011）
印　　装：北京云浩印刷有限责任公司
850mm×1168mm　1/32　印张7½　字数202千字　2007年3月北京第1版第1次印刷

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686）　售后服务：010-64518899
网　　址：http://www.cip.com.cn
凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定　价：16.00元

版权所有　违者必究

欢迎加入化学工业出版社读者俱乐部

您可以在我们的网站（**www.cip.com.cn**）查询、购买到数千种化学、化工、机械、电气、材料、环境、生物、医药、安全、轻工等专业图书以及各类专业教材，并可参与专业论坛讨论，享受专业资讯服务，享受购书优惠。欢迎您加入我们的读者俱乐部。

两种入会途径（免费）

◇ 登录化学工业出版社网上书店（**www.cip.com.cn**）注册

◇ 填写以下会员申请表寄回（或传真回）化学工业出版社

四种会员级别

◇ 普通会员　◇ 银卡会员　◇ 金卡会员　◇ VIP 会员

化学工业出版社读者俱乐部会员申请表

姓名:	性别:	学历:
邮编:	通讯地址:	
单位名称:		部门:
您从事的专业领域:		职务:
电话:	E-mail:	

◆ 您希望出版社给您寄送哪些专业图书信息？（可多选）

□化学 □化工 □生物 □医药 □环境 □材料 □机械 □电气 □安全 □能源 □农业 □轻工（食品/印刷/纺织/造纸）□建筑 □培训 □教材 □科普 □其他（　　）

◆ 您希望多长时间给您寄一次书目信息？

□ 每月 1 次　□ 每季度 1 次　□ 半年 1 次　□ 一年 1 次　□ 不用寄

◆ 您希望我们以哪种方式给您寄书目？□ 邮寄纸介质书目 □ E-mail 电子书目

此表可复印，请认真填表后发传真至 010-64519686，或寄信至：北京市东城区青年湖南街 13 号化学工业出版社发行部　读者俱乐部收（邮编 100011）

联系方法：

热线电话：010-64518888，64518899 E-mail: hy64518888@126.com

前　言

在当今的自然科学发展进程中，生命科学已成为发展最迅速的学科之一，它与人类生存、健康和社会发展密切相关，已经成为21世纪初的主导科学。近年来，分子生物学的出现不仅推动了生物科学研究的迅速发展，而且使之与工程的结合更加紧密，相继产生了发酵工程、蛋白质工程、基因工程等现代生物工程技术，同时触及、融合到各工科专业中。因此，了解和学习生命科学与工程的基础知识、发展现状和应用趋势，以及加深对学科交叉、渗透、融合的理解，激发探索和创造激情对非生物学专业的学生来说显得非常必要。

本教材可用于高等院校（尤其是工科院校）非生物学类专业公共课和生物工程类专业基础课。全书共分上、下两篇。上篇是生命科学基础知识介绍，内容包括生命的物质组成、物质能量代谢、基因与染色体、遗传病与基因治疗、人类基因组计划等基本概念、研究进展，微生物等内容；下篇概述了与生命科学相关的工程技术原理及应用，现代分子生物学技术与人类社会发展等方面的内容和前沿问题。此外，在各章节中添加了内容相关的生活热点知识介绍等。在编写中，力求将生命科学基础知识、基本理论与学科发展和工程原理结合起来，以科学的思维方法，深入浅出地介绍研究方法及成果应用；反映生命科学与其他学科间的交融，并提出尚待解决的理论和技术问题。希望通过这些知识的介绍，促使大学生不断提高对现代生命科学与工程技术的内涵、进展及其推动经济和社会发展的认识，激起对生命科学热点问题的兴趣，引导学生从多角度认识生命现象、理解生命本质、探究生命科学与技术同其他学科间的内在联系，促进其在不同学科领域相关知识的交叉融合，从而开阔他们的思路，发展他们的创新思维。

本书共十章，第一章、第二章、第四章由高晓蓉编写，第三章由夏秀英编写，第五章至第十章由李文利编写。动植物知识在中学阶段已学过，因此第四章只介绍了现代微生物学的有关知识，如果读者需要此方面的知识，请与作者联系（biogaoxr@blut.edu.cn）。

由于编者水平所限，不足之处在所难免，恳请读者批评指正。

编者

2007 年 2 月

目　录

上篇　生命科学基础

第一章　生命的化学组成基础 …… 1

第一节　生命的无机物质组成 …… 1

一、水 …… 1

二、无机盐 …… 1

三、微量元素与健康 …… 2

第二节　生命的有机物质组成 …… 3

一、蛋白质 …… 4

二、核酸 …… 8

三、糖 …… 10

四、脂类 …… 13

五、维生素 …… 16

六、营养与健康 …… 17

第二章　生命活动的基本功能单位——细胞 …… 19

第一节　细胞的形态结构 …… 19

一、原核细胞的结构 …… 19

二、真核细胞的结构 …… 20

第二节　细胞的物质和能量代谢 …… 24

一、物质的跨膜运输 …… 24

二、物质的合成与分解 …… 25

三、能量的合成与利用 …… 30

第三节　细胞的分裂与分化 … 35

一、细胞周期与细胞分裂 … 35

二、细胞全能性 …… 38

三、细胞分化 …… 38

四、自由基与衰老 …… 40

第四节　细胞凋亡 …… 43

一、细胞凋亡的概念 …… 43

二、凋亡相关的基因和蛋白 …… 44

三、细胞凋亡的形态学观察 …… 46

四、细胞凋亡的生化检测 … 47

第五节　癌细胞 …… 48

一、癌细胞的主要特征 …… 48

二、癌基因与抑癌基因 …… 49

三、癌细胞与细胞凋亡 …… 50

四、癌症与饮食 …… 51

第六节　细胞信号转导 …… 52

一、细胞间的通讯方式 …… 52

二、细胞通讯的要素 …… 53

三、生物大分子细胞信号传导中的作用 …… 54

第三章　基因与遗传 …… 56

第一节　遗传学基本定律 …… 56

一、分离定律 …… 56

二、自由组合定律 …… 58

三、孟德尔定律的延伸和

变化 …… 58
四、连锁与互换定律 …… 59
五、伴性遗传 …… 60
第二节 遗传的物质基础 …… 61
一、遗传的染色体基础 …… 61
二、遗传的分子基础 …… 62
三、基因的结构与功能 …… 64
四、基因的顺反子概念 …… 65
五、基因的现代概念 …… 66
第三节 遗传信息的传递与表达 …… 67
一、从 DNA 到 RNA——转录 …… 68
二、遗传密码与蛋白质合成——翻译 …… 69
三、中心法则 …… 72
四、基因表达调控 …… 73
第四节 遗传病与基因治疗 … 76
一、染色体畸变与染色体缺陷病 …… 77
二、基因突变与单基因及多基因遗传病 …… 79
三、基因治疗 …… 81
第五节 人类基因组计划简介 …… 86
一、基因组学 …… 86
二、人类基因组计划 …… 89
第六节 生物的进化 …… 91
一、生命的起源 …… 91
二、生物进化 …… 92
三、人类的起源与进化 …… 97
第四章 微生物 …… 99
第一节 微生物类群与形态结构 …… 99
一、细菌 …… 100
二、放线菌 …… 101
三、蓝藻(*cyanobacterium*) … 102
四、酵母菌(yeast) …… 103
五、霉菌(mould) …… 103
第二节 微生物的生长与死亡 …… 106
第三节 几类典型的微生物 …… 110
一、能源性微生物 …… 110
二、极端环境微生物 …… 112
三、非细胞型微生物——病毒(virus) …… 113

下篇 生物工程技术

第五章 细胞工程 …… 120
第一节 植物细胞工程技术 …… 120
一、植物组织培养 …… 121
二、植物体细胞杂交 …… 129
三、植物细胞大规模培养 …… 132
第二节 动物细胞工程技术 …… 136
一、动物细胞培养技术 … 136
二、动物细胞融合与单克隆抗体技术 …… 140
三、动物克隆 …… 143
四、干细胞工程 …… 147

五、试管婴儿 …… 149
第六章 基因工程 …… 150
第一节 基因工程的技术基础 …… 150
第二节 基因工程的基本内容 …… 156
一、外源基因的获得 …… 156
二、外源基因与载体的连接 …… 158
三、重组 DNA 导入宿主及阳性克隆筛选 …… 159
四、外源基因的表达 …… 160
五、表达产物的分离与纯化 …… 160
第三节 基因工程的应用 … 161
一、大肠杆菌表达 Hemolin 基因 …… 161
二、转基因植物 …… 162
三、转基因动物 …… 164
四、转基因产品的争议 … 165
第七章 蛋白质工程与酶工程 …… 167
第一节 蛋白质工程 …… 167
一、蛋白质工程的产生、发展及意义 …… 167
二、蛋白质工程的主要研究内容 …… 169
三、蛋白质工程的主要研究方法 …… 170
四、蛋白质工程的应用 … 177
五、蛋白质工程进展 …… 179
第二节 酶工程 …… 179
一、化学酶工程 …… 180
二、生物酶工程 …… 181
第八章 发酵工程 …… 183
第一节 生产中常用菌种的分离、选育和保藏 … 184
一、菌种的分离 …… 185
二、菌种的选育 …… 186
三、微生物菌种的保藏与复苏 …… 189
第二节 发酵工艺条件的确定 …… 190
一、培养基的选择和确定 … 191
二、发酵工艺的确定 …… 193
三、发酵产物的分离提取、意义 …… 198
第三节 发酵工程的应用与展望 …… 198
一、发酵工程与医药工业 …… 198
二、发酵工程与食品工业 …… 199
第九章 现代分子生物学技术 …… 201
第一节 PCR 技术 …… 201
一、PCR 技术的原理及应用 …… 201
二、实时荧光定量 PCR 技术 …… 203
三、微卫星 DNA 的 PCR 扩增技术——亲子鉴定技术 …… 205
第二节 生物芯片技术 …… 207
一、基因芯片 …… 207
二、蛋白质芯片 …… 208

第三节 RNA干涉技术 …… 209
一、RNAi的发现 …… 209
二、RNAi的作用机制 …… 210
三、RNAi的操作步骤 …… 210
四、RNAi的应用 …… 211
五、RNAi技术的展望 …… 211
第四节 DNA疫苗 …… 212
一、DNA疫苗的特点 …… 212
二、DNA疫苗的免疫机制 …… 213
三、DNA疫苗的接种途径 …… 214
四、存在问题 …… 214
第五节 酶联免疫技术 …… 214
一、酶联免疫技术原理 … 214
二、酶联免疫类型和操作步骤 …… 215
三、酶联免疫技术的应用 …… 216
第十章 生命科学与社会发展 …… 217
第一节 生物能源 …… 217
一、生物能源的概念 …… 217
二、生物能源材料的种类 …… 218
三、生物质能技术的发展状况 …… 219
四、发展方向 …… 221
第二节 生物材料 …… 222
一、仿生材料 …… 222
二、生物医用材料 …… 223
三、生物模拟材料 …… 224
第三节 生物信息 …… 225
一、生物信息学的研究内容 …… 225
二、应用与发展研究 …… 226
第四节 生物物理 …… 226
一、生物物理的发展历史 …… 226
二、生物物理的应用 …… 227
第五节 生物与环境 …… 228
一、发展历史 …… 228
二、生物与环境的关系 … 228
参考文献 …… 230

上篇　生命科学基础

第一章　生命的化学组成基础

虽然生命的形态、结构和功能变化无穷，但生命具有共同的化学物质基础。我们现在已知的参与生物体组成的元素共约有 30 多种，其中碳、氧、氮、磷是生命不可缺少的极为重要的元素。生物体在进化的过程中选择这些元素，继而形成各种无机化学分子和有机化学分子构成细胞，完成各种使命。由于组成生物体的各种化学物质相互间复杂的化学反应，才产生了各种各样的生命现象。

第一节　生命的无机物质组成

一、水

水是生物体含量最大和最重要的组成成分，生物体质量的 55%～90%是水，在生物体内以游离水或结合水的方式存在。水既是溶剂，又是物质运输的介质，参与生命活动的一切化学反应，没有水就没有生命。生物体内水的来源主要有三种：饮水、食物中的水和体内代谢产生的水。

二、无机盐

无机盐占生物体重量的 2%～5%，在生物体内一般以离子形式存在，主要有 Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+} 等阳离子和 Cl^-、SO_4^{2-}、HPO_4^{2-}、HCO_3^- 等阴离子。各种离子的比例与海水成分接近，成为生命起源于海洋的一个证据。这些物质有的是构成细胞的一部分，有的直接参与酶反应，参加细胞的新陈代谢过

程，还有的维持体内的渗透压和电解质平衡，维持生命正常活动及内环境的稳定。

Na^+是细胞外液中最主要的阳离子，K^+是细胞内液中最主要的阳离子，它们共同在机体内调节机体和细胞的渗透压。Fe^{2+}、Fe^{3+}与血红蛋白、肌红蛋白结合，参与气体的运输和交换过程。Ca^{2+}是构成骨骼和牙齿的主要成分，同时具有调节机体的生理功能。HCO_3^- 和 HPO_4^{2-} 构成机体中最重要的缓冲系统，维持机体内的酸碱平衡，使人体血液的 pH 能经常保持在 7.35～7.45 之间，在 7.35 以下，人的身体就会处于健康和疾病之间的亚健康状态，出现身体疲乏、记忆力衰退、注意力不集中、腰酸腿痛等现象；小于 7 时，会产生重大疾病；下降到 6.9 时，会变成植物人；如果只有 6.8～6.7，人就会死亡。

三、微量元素与健康

生命组成的最小物质单位是元素。以人体为例，参与人体组成的元素约有 30 种。其中含量较高的碳、氢、氧、氮占体重 95% 以上，钙、镁、钾、钠、磷、氯、硫等在体内含量在 0.01g/kg 以上，这些元素被称为常量元素。体内含量低于 0.01g/kg 的元素称为微量元素，如铁、锌、铜、锰、硒、碘、铬、氟、硼、硅、钼等是维持人体正常生命活动所不能缺少的。尽管人们对这些必需微量元素的需要量很少，但它们在体内不能合成，必须从膳食中不断供给。

体内的各种微量元素与人体的健康有着紧密的联系。

（1）锌　锌是人体中几十种酶的组成成分。缺锌可导致厌食、智力低下、免疫力下降、诱发肿瘤等。锌的食物来源很广泛，动物性食物含锌丰富而且吸收率高，其中鲜鱼和牡蛎的锌含量高达 100mg/100g 以上。

（2）硒　硒参加谷胱甘肽过氧化物酶的组成，参与清除体内的自由基，防止 DNA 突变和激活机体免疫防卫系统等，是人及动物抗氧化、延长寿命、防止细胞中毒和增强机体对疾病抵抗力的重要营养物质，低硒与肿瘤发生率上升有关。硒对于维持心脏功能是必

需的，缺硒可造成心脏严重损伤。海产品、肝、肾、肉和整粒的谷类是硒的良好来源。要注意的是，由于职业原因长期接触过多的硒化合物能引起硒中毒。

(3) 氟　高剂量的氟可引起骨髓的氟中毒。氟的不足则是造成龋齿和骨质疏松的重要原因。一般食物中含氟量较少，正常情况下，从饮水中摄入足量的氟即可满足人体的需要。

(4) 铜　铜被人体吸收后，一部分以铜蛋白形式储存于肝脏，其余的基本在各组织内参与合成细胞色素氧化酶、过氧化物歧化酶、酪氨酸酶等，对维护神经系统正常功能和保护细胞免受毒性有重要作用。此外，铜还对胆固醇代谢、心肌细胞代谢、激素分泌等许多生理、生化和病理生理过程都有影响。缺铜是易患冠心病的重要因素之一，而恶性肿瘤患者的铜含量肯定增高，可作为肿瘤活性的标志。

(5) 铬　铬是人体和动物必不可少的一种微量元素，其中+3价的铬才是人体必需的，其他形式如+4价、+5价或+6价的铬没有生物活性，而且+6价的铬对人体有剧毒，可致肿瘤或致死。铬是葡萄糖耐量因子的组成成分，具有激活胰岛素和降低血糖的作用，从而刺激机体糖代谢的正常进行。缺铬会引起糖尿病或动脉硬化等疾病，白内障、高血脂等也可能与长期缺铬有关。铬在天然食物中存在比较广泛，海洋生物是铬的良好来源。

(6) 锗　锗是一种免疫刺激剂，有明显的抗肿瘤活性。锗也是一种细胞生长促进剂，能控制寄生虫、细菌和真菌引起的各种疾病。锗的某些化合物基本属于无毒物质，但大剂量摄入会产生肝脏受损、肾功能衰竭等中毒症状。

总之，在正常生理状态下，体内的各种微量元素维持相对平衡。一旦这一平衡被打破，出现微量元素增多或减少，都可以导致生理功能失调或引发疾病。

第二节　生命的有机物质组成

除了上述无机分子外，丰富多彩的有机物是生命产生、存在与

延续的先决条件和物质基础。这些有机物主要是由 C、H、O、N 等元素组成，它们构成了糖、脂类、蛋白质和核酸等种类繁多的生物有机大分子。到现在已经发现了几百万种（为无机物的许多倍）有机物，且仍在被发现和人工合成。这些生物大分子在生命活动中本身具有其各自的生物功能。

一、蛋白质

蛋白质是生物体的重要组成成分，许多重要的生命现象和生理活动都是通过蛋白质来实现的，没有蛋白质就没有生命。蛋白质中含有大量的碳、氢、氧和氮四种元素，有的还含有少量的硫、磷、铁、铜、锰、锌等元素。尽管蛋白质种类繁多，结构复杂，但一般来说蛋白质的含氮量都比较接近且恒定，平均含氮量为 16%。测定蛋白质含量时，将测得的氮的质量乘以 6.25，就可计算出样品中蛋白质的含量。

（一）蛋白质的基本组成单位——氨基酸

蛋白质是大分子有机化合物，分子量一般从一万至几百万甚至上千万，它们在酸、碱或酶的作用下，水解成其终产物——氨基酸，因此氨基酸作为蛋白质的基本组成单位，影响着蛋白质的结构、形状和功能。

1. 氨基酸的结构

自然界中已经发现天然存在的氨基酸有 180 多种，用作蛋白质中的氨基酸共有 20 种。这 20 种氨基酸有十分相似的结构（见图 1-1）。

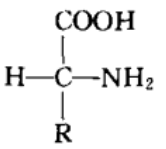

图 1-1　氨基酸通式

按照有机化学的命名规则，通式中间的碳原子称为 α-碳原子，和 α-碳原子相连的氨基和羧基被称为 α-氨基和 α-羧基。20 种天然氨基酸中，除脯氨酸外，都属于 α-氨基酸。除最简单的甘氨酸其侧链为氢原子外，其他氨基酸的 α-碳原子都是不对称碳原子（又称手性碳原子），可形成不同的空间构型（L-型、D-型），具有旋光性质。天然存在的蛋白质中的氨基酸皆为 L 型，故称为 L

型-α-氨基酸。

2. 氨基酸的分类

依据 R 侧链基团的化学结构，20 种天然氨基酸可以分为脂肪族、芳香族和杂环族三类，其中以脂肪族氨基酸最多。甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸（蛋氨酸）、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸都属于脂肪族氨基酸。苯丙氨酸和酪氨酸属于芳香族氨基酸。色氨酸、组氨酸和脯氨酸属于杂环族氨基酸。

按 R 基团的极性性质，20 种常见氨基酸可以分成非极性 R 基氨基酸，不带电荷的极性 R 基氨基酸，带正电荷的 R 基氨基酸，带负电荷的 R 基氨基酸。

按营养价值分类，可把氨基酸分为必需氨基酸和非必需氨基酸。构成蛋白质的 20 种天然氨基酸中，有 8 种氨基酸不能在人体内合成，必须由食物蛋白质供给，这八种氨基酸称为必需氨基酸。它们包括亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸（蛋氨酸）、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸。对于生长发育的婴儿，还要加上组氨酸。

3. 肽链中氨基酸的连接方式

现在公认蛋白质分子中氨基酸连接的基本方式是肽键。相邻的两个氨基酸分子脱水缩合形成肽键。两个氨基酸连接而成的肽称为二肽，三个氨基酸形成的肽称为三肽，以此类推，多个氨基酸形成的肽为多肽。多肽中的氨基酸称为氨基酸残基。多肽链基本上呈线形结构，处于多肽链两端的氨基酸残基，一个是有未参加肽链形成的游离 α-氨基，另一个是有未参与肽链形成的游离 α-羧基，通常游离 α-氨基的一端称 N 端，游离 α-羧基的一端称 C 端。所以，肽链是有方向性的，而且新生肽链的合成方向也是从 N 端向 C 端合成。

（二）蛋白质的一级结构

蛋白质的一级结构就是氨基酸序列。蛋白质的许多性质和功能，决定于它的一级结构。蛋白质中氨基酸顺序之间的差别大小可以说明不同物种亲缘关系的远近。目前常用 Edman 化学降解法测

定蛋白质的一级结构。蛋白质的一级结构也可以人工合成，例如1965年我国科学工作者完成了牛胰岛素的全合成。

（三）蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构是指多肽链中有规则重复的构象，共有三种基本类型，α-螺旋，β-折叠和β-转角。α-螺旋是蛋白质中最常见，含量最丰富的二级结构。一般认为，驱使蛋白质折叠的主要动力来自将暴露在溶剂中的疏水基团降至最小程度的需要，氢键是稳定二级结构的主要作用力。

（四）蛋白质的三级结构

多肽链在某些区域相邻的氨基酸残基形成有规则的二级结构后，相邻的二级结构单元组合在一起形成超二级结构，在此基础上，多肽链折叠成近乎球状的三级结构。维持蛋白质三级结构的作用力主要是非共价键（次级键），包括氢键、范德华力、疏水作用和离子键。球状蛋白质的构象比纤维状蛋白质复杂得多，它们具有多种多样的生物功能，二千多种酶都是球状蛋白质，如血红蛋白、抗体、激素蛋白等。

很多蛋白质是以三级结构的球状蛋白质的聚集体形式存在的，这样的聚集体称为蛋白质的四级结构。仅由一条肽链折叠成的蛋白质没有四级结构，如溶菌酶、肌红蛋白等。

（五）蛋白质高级结构的稳定性

蛋白质的高级结构是建立在各种次级键共同作用的基础上，相当牢固，从而确保蛋白质特异的生物学功能。某些物理和化学因素能使蛋白质分子的空间构象发生改变或破坏，导致生物学活性的丧失和一些理化性质的改变，引起蛋白质变性。物理因素有高温、紫外线、X射线、超声波和剧烈的振荡等；化学因素有强酸、强碱、尿素、去污剂、重金属、浓酒精等。例如，用搅蛋器或筷子不停地搅打鸡蛋清，使蛋清起泡成型是机械振荡作用使蛋白变性；高温加热可以破坏酶活性，杀灭和抑制微生物繁殖。

（六）酶

1. 酶的生物学意义

生物体内每时每刻都在进行着各种复杂的化学反应，在这种温和的条件下，许多复杂的化学变化进行得极为顺利和迅速，这些都得益于体内酶的生物学作用。酶在生物体的生命活动中占有极其重要的地位。

2. 酶的化学本质

酶是化学催化剂，酶的本质是蛋白质。有些酶仅由蛋白质构成，属于简单蛋白质，如胃蛋白酶。有些酶除蛋白质外，还需结合非蛋白质部分，才表现出酶的活性，如需一些有机小分子或金属离子的配合，有些蛋白质也有此作用，这些成分常常被称为辅酶（常用 Co 表示，如乙酰 CoA）。由酶蛋白与辅酶结合后形成的复合物称为全酶。许多维生素就是辅酶。辅酶本身无催化作用，但是在酶促反应中携带和传递底物的电子、原子或作用基团。

国际系统分类法将酶分为六个大类：①氧化还原酶类；②转移酶类；③水解酶类；④裂合酶类；⑤异构酶类；⑥合成酶类。

3. 酶的催化机制

酶能降低反应活化能，加快反应速度。在化学反应体系中，反应开始时，底物分子的平均能量水平较低，为“初态”。在反应的任何一瞬间底物中有一部分分子具有比初态更高一些的能量，高出的这部分能量称为活化能。具有活化能的分子处于“过渡态”，即活化态。这时就能形成或打破一些化学键，形成新的物质。所有催化剂，包括酶在内，能降低反应的活化能，即只需较少的能量就可使反应物进入活化态。例如没有催化剂时分解 H_2O_2，需活化能 75.24kJ/mol，用胶态钯作催化剂时，只需活化能 48.9kJ/mol，而当有过氧化氢酶催化时，活化能下降到 8.36kJ/mol 以下。

酶的催化作用发生在酶的活性中心。对于不需要辅酶的酶来说，活性中心就是酶分子在三维立体结构上比较靠近的少数几个氨基酸残基或残基上的某些基团；对于需要辅酶的酶来说，辅酶分子，或辅酶分子上的某一部分结构往往就是活性中心的组成部分。活性中心有两个功能部位，第一个是结合部位，一定的底物靠此部位结合到酶分子上，第二个是催化部位，底物的键在此处被打断或

形成新键，从而发生一定的化学变化。

4. 抑制剂对酶反应的影响

某些物质，不引起酶蛋白变性，但能引起酶活力下降，甚至丧失，致使酶反应速度降低。能引起这种抑制作用的物质称为酶的抑制剂。根据抑制剂与酶的作用方式及抑制作用是否可逆，可将抑制剂分为不可逆抑制剂和可逆抑制剂。有机磷化合物是一种重要的不可逆抑制剂，这类化合物强烈地抑制与中枢神经系统有关的胆碱酯酶，使乙酰胆碱不能分解为乙酸和胆碱。第二次世界大战曾使用过的毒气二异丙基磷酰氟（DFP）以及一些有机磷农药都属于此类。磺胺药是一种常见的可逆抑制剂，对-氨基苯磺酰胺药物的结构与某些细菌生长、繁殖所必需的对-氨基苯甲酸十分相似，后者在二氢叶酸合成酶的作用下合成二氢叶酸，二氢叶酸是嘌呤核苷酸合成所需的重要辅酶——四氢叶酸的前体，磺胺药则竞争性地与二氢叶酸合成酶结合，阻止对氨基苯甲酸与酶结合，从而抑制细菌生长、繁殖。

二、核酸

核酸是一类携带生物遗传信息和指导蛋白质生物合成的大分子化合物。核酸是遗传变异的物质基础。

（一）核酸的基本结构单位——核苷酸

一个核苷酸分子由一个碱基、一个磷酸和一个戊糖分子组成。DNA 和 RNA 中每一个核苷酸中戊糖的 3′-OH 和相邻核苷酸的 5′-磷酸相连，亦即核苷酸间是通过 3′,5′- 磷酸二酯键相连的。生成的多核苷酸链一侧末端为游离的 5′-磷酸基（5′端），另一侧末端为游离的 3′-羟基（3′端）。所以，核酸链是有方向性的，而且新生核酸链的合成方向也是从 5′端向 3′端合成。

（二）DNA 的分子结构

构成 DNA 分子的四种碱基有腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）。Chargaff 等在 1950 年的研究中发现，所有 DNA 中 A 与 T、C 与 G 的摩尔含量相等，这一发现为 DNA 双螺旋结构模型的建立提供了依据。

1. DNA 的一级结构

DNA 的一级结构是指 DNA 分子中的四种脱氧核糖核苷酸，通过 3′,5′- 磷酸二酯键排列的顺序。虽然只有四种脱氧核糖核苷酸，但是生物界物种的多样性都寓于它们千变万化的不同排列之中。

2. DNA 的二级结构

目前公认 DNA 双螺旋结构是 DNA 的二级结构。由于盐溶液中含水量不同，DNA 的二级结构有 A-DNA、B-DNA 和 Z-DNA 三种，生物体内天然状态的 DNA 几乎都以 B-DNA 存在。B-DNA 结构中两条反向多核苷酸链平行围绕同一中心轴缠绕；碱基对位于双螺旋内侧，相邻碱基对之间夹角为 36°，沿中心轴每旋转一周有 10 个核苷酸，高度为 3.4nm，螺旋直径为 2nm。

3. 环形 DNA

生物体内有些 DNA 是以双链环形 DNA 形式存在的，如某些病毒 DNA，细菌质粒 DNA、真核细胞中线粒体 DNA、叶绿体 DNA 等。这些结构比双螺旋更为复杂。

（三）RNA 的分子结构

构成 RNA 分子的四种碱基有腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和尿嘧啶（U）。生物细胞内都含有三种主要的 RNA，即核糖体 RNA（rRNA）、转运 RNA（tRNA）、信使 RNA（mRNA）。此外真核细胞中还含有少量核内小 RNA（snRNA）。tRNA 约占全部 RNA 的 15%，它的生理功能主要是在蛋白质生物合成中运输活化的氨基酸。mRNA 约占总 RNA 的 3%～5%，生理功能是将遗传信息从细胞核带到核外核糖体上，是蛋白质合成的模板。不同的蛋白质均有其各自特有的 mRNA 模板，其种类多、含量少、寿命短。rRNA 是细胞内含量最多的 RNA，约占 RNA 总量的 80%以上，生理功能是与蛋白质共同构成核糖体，参与蛋白质合成。

1. RNA 的一级结构

RNA 的一级结构是指 RNA 分子中的四种核糖核苷酸，通过

3′,5′- 磷酸二酯键排列的顺序。不同类型 RNA 的一级结构有一些目前还并不清楚。

2. RNA 的二级结构

RNA 单链分子在某些区域通过自身回折形成双链结构，双链结构中彼此配对的碱基之间构成双螺旋区，不能配对的碱基则形成突环被排斥到双螺旋外。目前对 tRNA 的二级结构研究比较清楚，tRNA 的二级结构都呈三叶草形，三叶草形结构由氨基酸臂、二氢嘧啶环、反密码环、额外环和 TΨC 环五部分组成。

3. RNA 的三级结构

目前研究比较清楚的只有一些 tRNA 三级结构。tRNA 三级结构的形状像一个倒写的 L 字母。

（四）核酸高级结构的稳定性

维持核酸空间结构的作用力主要是氢键和碱基堆砌力。有些物理因素会破坏氢键和堆砌力，使核酸分子的空间结构改变，从而引起核酸理化性质和生物学功能改变，这种现象称为核酸的变性。核酸变性时，双螺旋结构打开，在适当条件下，两条彼此分开的链重新由氢键连接而恢复双螺旋结构，这一过程叫做核酸的复性。核酸分子的变性和复性被发展成为一项分子生物学技术——分子杂交。

三、糖

糖是生物界三大基础物质之一，是自然界最丰富的有机物质，具有广泛的化学结构和生物学功能。它主要是由绿色植物经光合作用形成的。糖类物质主要由碳、氢、氧三种元素组成，分子式通常以 $C_n(H_2O)_n$ 表示。

糖类物质的主要生物学作用是通过氧化而释放出能量，以满足生命活动的需要（下一章将详细介绍）。糖类和脂类是生物体主要的结构物质，许多糖及其衍生物还与蛋白质或脂类结合成糖蛋白和糖脂。它们不仅是肌体的重要组成成分，还具有独特的生物学功能，如抗体、激素、酶等许多都是糖蛋白。

通常根据糖能否水解和水解产物分为单糖、寡糖和多糖三大类。

（一）单糖

单糖一般是含有3～6个碳原子的多羟醛或多羟酮，不能被水解。根据碳原子的数目，单糖可分为丙糖、丁糖、戊糖和己糖。在食品营养学上比较重要的单糖有戊糖和己糖，以下介绍几种重要的单糖。

1. 葡萄糖

己糖中葡萄糖数量最多，在自然界分布亦广。葡萄糖是机体吸收、利用最好的单糖。它在体内吸收速度最快，向机体提供能量。有些器官如大脑、骨髓质、肺组织、红细胞等完全依靠葡萄糖功能。人体内血糖为葡萄糖。葡萄糖是多种寡糖（如蔗糖、麦芽糖、乳糖等）和多糖（糖原、淀粉、纤维素等）的基本组成单位。葡萄糖常见的衍生物葡萄糖醛酸是肝脏内的解毒剂，用于治疗肝炎和肝中毒等。

2. 果糖

果糖广泛分布于生物界，多存在于水果中，蜂蜜中含量最高。果糖是糖类中最甜的糖。人体的肝脏是利用果糖的器官，因此果糖的代谢可以不受胰岛素的制约，糖尿病人可食用果糖。由于果糖甜度高，风味好，溶解度高，保湿性强，可用来做面包、糕点、果酱、蜜饯、罐头及其他食品。

3. 核糖及脱氧核糖

它们是核酸的组成成分，其衍生物核醇是某些维生素与辅酶的组成成分。

（二）寡糖

寡糖是由比较少数分子的单糖（2～10个）缩合形成的糖。寡糖中以双糖分布最为普遍，具有重要营养意义。与日常生活密切相关的双糖有蔗糖、麦芽糖和乳糖，三者均易水解为单糖。

1. 蔗糖

蔗糖是由一分子的葡萄糖和一分子果糖脱水缩合而成。日常食用的糖主要是蔗糖。甘蔗、甜菜、胡萝卜和有甜味的果实富含蔗糖，甘蔗和甜菜中含量最高。蔗糖易于发酵，同时产生酸，引起龋

齿。蔗糖在工业生产上广泛应用，一般按色泽和形状分为白糖、红糖、冰糖和方糖等。蔗糖被加热到150℃即开始融化，继续加热就形成一种微黄色黏稠的融化物，菜肴拔丝就是利用蔗糖的这个物理特性。

2. 麦芽糖

麦芽糖又称饴糖，大量存在于发芽的谷粒，特别是麦芽中，由淀粉水解生成。它是由两个葡萄糖分子缩合、失水形成的，其熔点在102～108℃之间。在食品加工中当温度升高时，麦芽糖颜色逐渐变深至焦黑，这一特点可用于给烤鸭上色。

3. 乳糖

乳糖是由一分子的葡萄糖和一分子半乳糖构成的双糖，是动物乳汁的主要成分。乳糖不仅是婴儿体内碳水化合物的主要来源，而且它还能保证婴儿肠道中最佳的肠菌丛数，并能促进钙的吸收。有些人体内缺乏乳糖酶，乳糖在小肠中不能水解为单糖，当这类人群摄入牛奶或其他乳制品时，会出现急性腹痛和腹泻等代谢紊乱，也称为乳糖不适症。

（三）多糖

多糖是由多个单糖分子缩合、失水而形成的大分子化合物。它们具有复杂的生理功能，在动植物和微生物中起着重要的作用。多糖如果由一种单糖缩合而成，如淀粉，糖原，纤维素等，称为均一多糖，如果由不同类型的单体缩合而成，如透明质酸，称为不均一多糖。多糖在水溶液中不形成真溶液，只能形成胶体，没有甜味。

1. 淀粉

淀粉几乎存在于所有绿色植物的大多数组织中，是自然界供给生命最丰富的碳水化合物。淀粉分子是由单一的葡萄糖分子组成的，分直链淀粉和支链淀粉。马铃薯含有20%的直链淀粉，其余为支链淀粉，糯米淀粉全部为支链淀粉，豆类淀粉全部是直链淀粉。直链淀粉加热易溶于水，支链淀粉不溶于水。淀粉在体内经淀粉酶的作用经过中间产物糊精，最后水解为葡萄糖。淀粉除供食用外，在食品工业中主要用于发酵酿酒和水解制糖。

2. 糖原

糖原是葡萄糖在动物及人体内储存的主要形式，有“动物淀粉”之称。它在高等动物的肝脏和骨骼肌中最为丰富。当机体需要时，糖原在酶的作用下迅速转化为葡萄糖参与体内代谢。肝糖原的合成和分解依据血糖水平的高低。

3. 纤维素

纤维素是地球表面最丰富的有机化合物，它占植物界碳含量的50%。最纯的纤维素来源是棉花，含高于90%的纤维素。纤维素的化学结构与淀粉相似，是直链聚合物，不溶于水。除反刍动物外，一般动物肠道中无纤维素酶，不能消化纤维素。

4. 半纤维素

半纤维素大量存在于植物木质化部分，它还和纤维素、木质素同时存在于植物细胞壁，用稀酸水解则产生己糖和戊糖，所以它是多聚戊糖（如多聚阿拉伯糖和多聚木糖）和多聚己糖（如多聚半乳糖和多聚甘露糖）的混合物。

5. 几丁质

几丁质（壳多糖）是昆虫、蟹、虾甲壳中的主要成分，结构和纤维素相似。组成几丁质的单糖是葡萄糖的衍生物——*N*-乙酰氨基葡萄糖。用酸、碱处理虾、蟹壳可以获取大量几丁质。几丁质用来制造人造皮肤，做外科手术缝合线，更被用作保健食品，具有降血脂、刺激免疫功能等功效。

6. 膳食纤维

膳食纤维是木质素与不能被人体消化的多糖的总称，包括纤维素、半纤维素、果胶等。继糖、蛋白质、脂肪、水、矿物质和维生素之后，被誉为“第七大营养素”。膳食纤维摄入不足可导致多种疾病的发生，因此膳食纤维在预防成人病中具有很大的作用，受到越来越多人的青睐。膳食纤维的功能有：吸水通便；改善菌群；降低血清胆固醇；减肥；利于胰岛素分泌；降低患乳腺癌的可能等。

四、脂类

脂类物质是化学组成和结构较为复杂的一大类有机物，广泛分

布于动植物体内。脂类物质的共同特性是不溶于水，易溶于乙醚、氯仿、苯、丙酮等非极性溶剂中。根据脂类的主要成分，即脂肪酸存在与否将其分为简单脂类（包括萜类、类固醇类和前列腺素类）和复合脂类（包括脂酰甘油类、磷脂类、神经鞘脂类）。

（一）脂酰甘油类——油和脂肪

脂酰甘油是脂肪酸和甘油所形成的酯（图 1-2）。三脂酰甘油，又称甘油三酯，是脂类中含量最丰富的一大类，是日常食用的动物油和植物油的主要成分，习惯上又称为油脂。甘油三酯是生物体能量的重要来源，它可以被水解为脂肪酸和甘油，释放入血供全身各组织氧化利用。

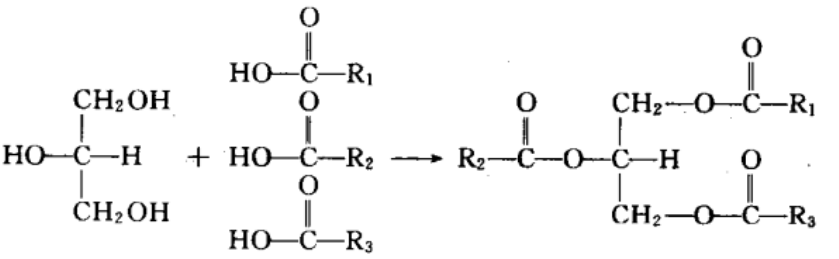

图 1-2　甘油三酯

所有的脂肪酸都有一条长的碳氢链。碳氢链有饱和的，如月桂酸、软脂酸、硬脂酸；有的碳氢链中含有一个或两个双键，为不饱和脂肪酸，如油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸。其中，亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸是人体不可缺少的营养素，人体自身不能合成，必须从食物中获得，所以称为必需脂肪酸。植物油中不饱和脂肪酸的含量比动物脂肪高，因此在营养价值上比动物脂肪重要。

（二）磷脂类

磷脂是分子中含磷酸的复合脂，有磷酸甘油酯、神经鞘磷脂和缩醛磷脂等。磷脂是细胞膜的重要成分，各种膜结构都含有磷脂。

1. 磷酸甘油酯

甘油是三碳分子，三个碳原子中两个与脂肪酸相连，第三个与磷酸及氨基醇（如胆碱、乙醇胺或丝氨酸）或肌醇结合成酯，这样就构成磷酸甘油酯。如磷脂酰胆碱（卵磷脂）、磷脂酰乙醇胺（脑

磷脂)、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇等。卵磷脂能促进肝脏脂肪的运输，当肝脏磷脂酸胆碱合成不足时，脂肪在肝脏堆积，形成脂肪肝。脑磷脂是凝血致活酶辅基的成分，与凝血有关。

2. 鞘氨醇磷脂类

鞘氨醇磷脂不是甘油衍生物，而是鞘氨醇上的氨基连接脂肪酸，其羟基与磷酰胆碱相连。鞘磷脂也是生物膜的主要脂质成分。

（三）萜类和类固醇类及前列腺素

这三种物质都不含脂肪酸。它们在生物体组织和细胞内含量虽少，但却执行许多重要的生物功能。

1. 萜类

萜类是异戊二烯及其衍生物的聚合物。多数萜类都具有特殊臭味，例如柠檬苦素、薄荷醇、樟脑。维生素 A、维生素 E、维生素 K 都属于萜类。

2. 类固醇类

胆固醇、胆汁酸、孕酮、雌二醇、睾酮、强心苷、维生素 D_3、维生素 D_2 都属于此类物质。胆固醇是脊椎动物细胞的重要成分，在神经组织和肾上腺中含量特别丰富，它们增加膜的稳定性，调节膜的流动性，参与体内代谢，同时也可沉积于血管壁造成血管栓塞。

3. 前列腺素

前列腺素是花生四烯酸以及其他不饱和脂肪酸的衍生物。它不只分布于精液，几乎存在于人和哺乳动物的各种细胞和体液中，男女生殖系统中含量最多。它在体内含量很低，却具有很强的生理活性。前列腺素调节控制的生理过程有：平滑肌收缩降血压；抗血小板凝集作用；抑制凝血和血栓的形成；促进分娩，用于引产。此外，还参与炎症反应、免疫调节、神经传递等。

（四）结合脂类

1. 糖脂

糖脂是指含有糖基的脂质化合物，例如脑苷脂和神经节苷脂。脑苷脂大量存在于脑和周围神经组织，在神经髓鞘的多层膜中含量

最丰富。变化最多最复杂的糖脂是神经节苷脂，是神经元细胞膜特征成分，它的代谢异常可导致某些疾病的发生。

2. 脂蛋白

脂蛋白是脂质和蛋白质组成的复合物。几乎所有的脂蛋白都具有运输（载体）的功能，蛋白质与脂质结合后，可将脂质从吸收部位运送到储存或相关部位，发挥其功能，同时脂蛋白是生物膜结构的组成者。

五、维生素

维生素是一类天然有机物，人体内不能合成，必须从食物中摄取。食物中维生素含量极少，但却是人体生长和健康所必需的。维生素的命名一般是按照它们被发现的顺序，依字母排列，而维生素K是按荷兰文“凝血因子”命名的。按照维生素溶解性能可分为脂溶性维生素和水溶性维生素两大类。

（一）脂溶性维生素

脂溶性维生素有维生素A、维生素D、维生素E、维生素K等。

1. 维生素A

维生素A的化学名称为视黄醇。一分子β-胡萝卜素分子可以转化为两分子的视黄醇。维生素A的生理功能有：保持正常的视觉；保持上皮细胞的完整和健全，增强抵抗力；维持骨骼和牙齿的正常发育；增强生殖力；清除自由基等。

2. 维生素D

维生素D在机体内需要在紫外线照射被激活后，才具有作用。如促进钙和磷在小肠内的吸收，促进牙齿和骨骼的生长，促进皮肤代谢。

3. 维生素E

维生素E化学名称为生育酚，自然界有八种生育酚。维生素E是抗氧化剂，能强有效地清除自由基，保护机体细胞膜及生命大分子免遭自由基的攻击，不受致癌物的伤害。此外，还具有抗衰老、提高机体免疫力、治疗贫血的作用。

4. 维生素K

维生素 K 有两种存在形式，维生素 K_1 和维生素 K_2，维生素 K_1 存在于绿叶植物中，维生素 K_2 存在于发酵食品中。维生素 K 的生理功能跟凝血有关，具有促进凝血的作用。

（二）水溶性维生素

水溶性维生素有维生素 C 和维生素 B 家族（维生素 B_1，维生素 B_2，维生素 B_6，维生素 B_{12} 等）。

1. 维生素 C

维生素 C 化学名称为抗坏血酸。它的生理功能除了防止坏血病，还有促进伤口愈合，保护细胞膜完整，改善物质吸收、代谢，阻断亚硝胺形成，清除体内自由基等。

2. 维生素 B 族

维生素 B_1 的化学名称为硫胺素，缺乏硫胺素的人易患脚气病。

维生素 B_2 的化学名称为核黄素，人体缺乏核黄素表现为口舌溃疡、脂溢性皮炎等。

维生素 B_3 的化学名称是泛酸，又称遍多酸，它的主要作用就是以乙酰辅酶 A 的形式参加代谢过程。

维生素 B_5 又称尼克酸、烟酸，是组织中重要的递氢体，参与葡萄糖的酵解、脂肪酸和胆固醇的合成、丙酮酸代谢等。

维生素 B_6 的化学名称为吡哆醛、吡哆醇和吡哆胺，是体内很多酶的辅酶成分。

维生素 B_{11} 的化学名称是叶酸，叶酸只有被还原为四氢叶酸才具有生理意义，参与核酸中嘌呤和嘧啶的合成。

维生素 B_{12} 的化学名称为钴胺素，缺乏维生素 B_{12} 的人易患贫血症。

六、营养与健康

一个人的生命过程离不开营养物质。从受精卵开始就要从母体中吸取营养物质，开始正常的生长和发育。婴幼儿和青少年的合理营养，对他们的身体和智力发育都起着决定性的作用。对中老年人来说，合理的营养可以保持生命的持久活力，延缓机体的衰老过程，达到延年益寿的目的。充分、合理的营养还可以帮助正常人和

病人增强对疾病的抵抗能力，增强人体的免疫机能。但是，随着人们生活水平的提高，在一些地区和部分人群中开始出现肥胖、高血压、高血脂、动脉硬化、癌症等大多因营养失调所引起的疾病，这都是由于对健康知识的缺乏而产生的。为此，我们必须养成科学的、文明的健康饮食习惯，让营养与健康达到和谐的促进作用。

平衡、全面的膳食不仅使营养成分种类齐全，而且比例适宜，对健康大有好处。营养过剩可以造成体内各种营养素过多积累，对健康不易。例如动物性脂肪摄入过多，可以使血液中胆固醇含量增高，引发心肌梗死、高血压、糖尿病、脂肪肝和肥胖症等。摄入过量的蛋白质也会对身体健康造成危害，较多的蛋白质分解产物造成体内酸度增高，使人体处于亚健康状态，增加癌症发病的危险、诱发心脏病等。维生素和无机盐摄入过多也能引起一些中毒反应和重症疾病。营养物质的缺乏使身体的营养素不足以增生新组织，维持正常代谢机能。

营养对健康的影响具有长期性，每个人要随自身情况变化不断调整、搭配自己的膳食平衡，并养成良好的饮食习惯，这样才能充分体现营养给健康带来的重大促进作用。

第二章　生命活动的基本功能单位——细胞

17 世纪以前，人们对细胞一无所知。直到 1665 年，英国人胡克用自制的显微镜观察到栎树皮切片，发现蜂窝状的结构以后，才对细胞进行了充分的研究。1938 年德国植物学家施莱登和施旺提出“一切生物体都是由细胞组成的”细胞学说。细胞学说的建立把生命世界统一起来，由此成为 19 世纪自然科学的三大发现之一。

第一节　细胞的形态结构

细胞是生命的基本结构单位和功能单位。单细胞生物，如大肠杆菌、酵母、螺旋藻，一个细胞就是一个生命个体。我们肉眼所能见到的几乎所有的生命都是由许许多多细胞组成的生命个体，其中的每一个细胞都担负着生命功能。

大多数细胞非常小，需借助显微镜才能看见。目前已知世界上最小的单细胞个体是支原体，其直径为 100nm，细菌的细胞大小为 1～2μm，人的红细胞直径约 6～8μm，鱼、蛙、鸟等动物卵的卵黄细胞约 3cm。但是有些细胞，如棉花纤维细胞长度为 10cm，人的神经纤维长达 1m，鲸的神经纤维 10m。

细胞的形状各异，有球形、椭球形、柱状、扁平形、梭形、星形、多面体等。

生命世界中的所有细胞分为两大类：原核细胞和真核细胞。它们在细胞的化学成分、分裂方式、细胞器组成等许多方面都有不同之处。

一、原核细胞的结构

常见的由原核细胞构成的生物体有细菌、放线菌、蓝藻、支原体、衣原体、立克次体等。原核细胞主要的共有特点如下。

（一）拟核

原核细胞没有核膜，遗传物质集中在一个没有明确界限的低电子密度区，称为拟核。染色体 DNA 为裸露的环状分子，通常不与 RNA 和蛋白质结合。拟核是原核细胞与真核细胞的主要区别。

（二）细胞壁

大部分原核细胞，如细菌、放线菌、蓝藻、支原体，都有细胞壁。胞壁酸和二氨基庚二酸是原核细胞的细胞壁化学组成成分。细胞壁保护原核细胞免受侵害。细胞壁上有附属结构，如鞭毛。用溶菌酶处理细胞或在培养基中加入青霉素，可破坏或抑制细胞壁的形成。

（三）细胞膜

原核细胞膜内陷或折叠成囊状结构，叫间体。许多酶都定位在细胞膜上，因此细胞能量代谢和很多合成代谢均在质膜上进行。

（四）细胞质

细胞质中有许多酶和一些核糖体。能进行光合作用的光合细菌细胞质内含有色素体。固定二氧化碳的细菌胞质中有羧酶体。

二、真核细胞的结构

构成真菌、动植物体的细胞都是真核细胞。动植物细胞形态结构的主要差异在于：植物细胞有叶绿体、细胞壁和中央液泡，而动物细胞没有。光学显微镜下，可以清楚地看到真核细胞由细胞核、细胞质和细胞膜三部分组成。在电子显微镜下，只能看到真核细胞的膜相结构和非膜相结构。

（一）细胞核

真核细胞与原核细胞的主要区别，就在于有无完整的细胞核。细胞核的作用是使细胞通过基因的选择性表达，控制蛋白质的合成，从而控制新陈代谢活动；另一个作用是通过遗传物质的复制和细胞分裂，保持细胞世代的连续性。

细胞核外周由双层平行的生物膜包围，称为核膜，外层与粗面内质网相连，上面附着核糖体。核膜内层有一层致密的纤维状结

构，称为核纤层，它对核膜的强度、维持核的形态具有一定作用。细胞核内储藏着细胞的全部遗传信息，它们由 DNA 分子的核苷酸序列编码而成。细胞分裂时，DNA 与蛋白质共同组合包装成一条条染色体，染色质和染色体在化学本质上没有差异，只是分子构型不同，是遗传物质在细胞周期不同阶段的不同表现形式。在电镜下，可以看到 DNA、RNA 和蛋白质比较密集的区域，称为核仁，核仁是核糖体 RNA 合成的场所，核仁的大小、形状、数目随生物种类、细胞种类以及生理状况不同而有差异。

（二）内质网

内质网是由大小不同的小管、小泡或扁囊相互沟通连接形成的网状膜系统。根据结构与功能，内质网可分为有核糖体附着的粗面内质网和无核糖体附着的光面内质网。粗面内质网膜上有核糖体连接蛋白，可与核糖体大亚基结合，因此它们共同合成分泌性的蛋白（如胰酶、抗体、各种激素等）和多种膜蛋白。新合成的肽链在内质网腔中折叠加工，部分蛋白质还进行糖基化修饰，以保证合成具有正确高级结构和有生物活性的蛋白质。在胰腺外分泌细胞和浆细胞中，粗面内质网非常发达。光面内质网是脂质（脂类和胆固醇）合成的重要场所，所占的区域很小，主要是将内质网中折叠加工好的蛋白质或脂质转移到高尔基体内。此外，肝脏细胞中的光面内质网还具有解毒功能。

（三）核糖体

核糖体是合成蛋白质的细胞器。呈颗粒状结构，没有膜包围，主要成分是 RNA 和蛋白质。每个核糖体由大、小亚基组成。小亚基识别 mRNA 起始密码子，并与之结合，大亚基含有转肽酶，催化肽链合成。核糖体分为附着核糖体和游离核糖体，前者附在内质网或核膜表面，主要合成分泌蛋白质，后者游离在细胞质基质中，主要合成细胞本身所需要的结构蛋白质，常见于淋巴细胞及蛋白质代谢旺盛的细胞中。目前已发现的核糖体有两种类型：70S 和 80S（S 为沉降系数，S 值越大，核糖体颗粒沉降速度越快）。70S 核糖体广泛存在于原核细胞中，真核细胞内的核糖体均为 80S。

（四）高尔基体

在电镜下，高尔基体是由排列较为整齐的扁平膜囊堆叠在一起，以及周围大小不等的囊泡共同构成的比较复杂的膜性结构。高尔基体是一种有极性的细胞器，扁平囊弯曲成盘状，形成的凸面（也叫顺面）向着核膜或内质网，凹面（反面）面向细胞膜。小囊泡在顺面一侧，一般认为它是由粗面内质网“出芽”形成的，将蛋白质运送到扁平囊中。大囊泡（分泌泡或浓缩泡）多见于反面，一般认为大囊泡是由扁平囊局部膨突脱落形成，然后与细胞膜融合，将分泌物排出。因此，高尔基体的主要功能是将内质网合成的多种蛋白质进行加工（糖基化）、分类与包装，然后将其运送到细胞特定的部位或分泌到细胞外。

（五）溶酶体与过氧化物酶体

1. 溶酶体

溶酶体是由单层膜围绕，内含多种酸性水解酶类的囊泡状异质性细胞器。一般认为它是由高尔基体复合体囊泡出芽而生成。刚刚脱落的溶酶体未与底物作用，被称为初级溶酶体，当其与底物结合并进行消化作用，这时称之为次级溶酶体。几乎在所有的动物细胞中都有溶酶体，植物细胞内的圆球体及中央液泡与溶酶体的功能相似。目前已在不同种类的溶酶体中发现 60 多种酸性水解酶，因此它们赋予溶酶体的基本功能就是清除无用的生物大分子、衰老的细胞器及衰老损伤和死亡的细胞，某些特殊功能的细胞能在溶酶体的作用下，识别并吞噬细菌、病毒等入侵细胞者，实现防御功能。此外，两栖类发育过程中蝌蚪尾巴的退化、哺乳动物断奶后乳腺的退行性变化、受精过程时相当于溶酶体的精子顶体破裂溶解卵细胞外的包被等过程都与溶酶体有关。

2. 过氧化物酶体

又称微体，也是由单层膜围绕的，但是却内含氧化酶类的细胞器。它与溶酶体形态、大小相似，都是异质性细胞器，但过氧化物酶体中的尿酸氧化酶等常形成晶格状结构，因此可作为电镜下识别的主要特征。这两种细胞器在成分、功能上都有很大的差异。过氧

化物酶体不是由高尔基体产生，而是由已有的过氧化物酶体分裂形成的子代。过氧化物酶体中含有两种酶：一是氧化酶，将底物氧化形成 H_2O_2；二是过氧化氢酶，将 H_2O_2 分解，形成水和氧气，使细胞免受 H_2O_2 的毒害。在肝脏和肾脏细胞中的过氧化物酶体可氧化分解血液中的有毒成分，起到解毒作用，例如饮进的酒精几乎半数是在过氧化物酶体中氧化成乙醛的。在油料种子萌发过程中，过氧化物酶体降解储存在子叶和胚乳中的脂肪酸，并进一步转变成葡萄糖以满足种子萌发需要。

（六）细胞骨架

细胞骨架是指真核细胞中的蛋白纤维网架体系。狭义的细胞骨架指细胞质骨架，包括微丝、微管和中间纤维。广义的细胞骨架包括细胞核骨架、细胞质骨架、细胞膜骨架和细胞外基质。

1. 细胞核骨架

狭义的细胞核骨架是指在真核细胞核内，除了核被膜、核纤层、染色质与核仁以外的纤维蛋白网架结构体系，即核基质。广义的概念，核骨架应包括核基质、核纤层和染色质，它们有助于维持和稳定染色质有序的结构，从而使 DNA 正确复制、表达。

2. 细胞质骨架

细胞质骨架作为细胞质基质的主要结构成分，不仅与维持细胞的形态、细胞的运动、细胞内的物质能量传递有关，也为细胞质基质中其他成分和细胞器提供锚定位点。例如，微丝参与肌肉收缩、变形运动、胞质分裂等；微管与其他蛋白共同装配成纺锤体、基粒、中心粒、鞭毛等结构，参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂；中间纤维可能与细胞分化、RNA 的运输有关。

3. 细胞膜骨架

细胞膜主要通过锚蛋白常常与膜下的结构相互联系，协同作用。膜骨架是指细胞膜下与膜蛋白相连的由纤维蛋白组成的网架结构，参与维持细胞膜的形状并协助质膜完成多种生理功能。

4. 细胞外基质

（1）细胞连接　细胞连接是多细胞生物体相邻细胞间通过细胞

表面某些区域特化彼此连接，实现物质和信息沟通的重要组织方式。根据行使的功能，细胞连接可分为封闭连接、锚定连接和通讯连接。在植物细胞中只有通讯连接一种方式，即胞间连丝。

（2）细胞外基质　细胞外基质是指分布于细胞外空间，由细胞分泌的蛋白和多糖构成的网络结构。胞外基质的成分有胶原、糖胺聚糖和蛋白聚糖、层黏连蛋白和纤连蛋白、弹性蛋白。植物细胞壁由纤维素、半纤维素、果胶质等物质构成。细胞外基质将细胞粘在一起构成组织，同时，在组织中或组织之间起支持作用。胞外基质的三维结构和成分的变化，往往引起细胞微环境改变，从而对细胞形态、生长、分裂、分化和凋亡起重要的调控作用。

第二节　细胞的物质和能量代谢

生命是物质运动的一种形式，要运动就必然会有物质和能量的传递和转换。物质代谢和能量代谢是相互依存的。物质代谢过程总是伴随着能量的转换，例如光合作用，绿色植物利用光能把简单的无机物合成有机物，同时把太阳能转化为化学能，储存在有机物中。糖酵解和三羧酸循环使有机物氧化成为 CO_2 和 H_2O，同时把有机物分解产生的化学能转化为 ATP 分子的高能磷酸键中。细胞是生命活动的基本组成单位，也是物质和能量代谢的基本单位。

一、物质的跨膜运输

新陈代谢是生命的最基本的特征，而生命活动的最基本单位就是细胞。因此要求细胞与外界进行物质交换：营养物质的吸收，代谢产物的排出，细胞内外物质、离子渗透压的平衡。那么，这些物质是怎样进出细胞的，即怎样穿过细胞膜的呢？

（一）被动运输

物质由高浓度向低浓度运动，不需要细胞提供能量（不消耗 ATP）的跨膜转运方式。转运的动力来自膜两侧的物质浓度梯度，分为简单扩散和协助扩散两种。

1. 简单扩散

脂溶性物质（如苯、乙醇、甾类）、H_2O 等不带电荷的小分子

可以沿着浓度梯度自由进出细胞膜。这种方式的跨膜转运不需要细胞提供能量，也没有膜蛋白的协助，因此称简单扩散。

2. 协助扩散

一些非脂溶性物质（如葡萄糖、氨基酸、核苷酸）和无机离子（如 Na^+、K^+）等顺其浓度梯度跨膜转运时，必须依靠膜上专一性很强的载体蛋白携带其通过脂质双层膜，这种转运方式称为协助扩散。

（二）主动运输

主动运输是指由载体蛋白所介导的物质逆浓度梯度，由低浓度向高浓度运动，需要细胞提供能量的跨膜方式。例如 Na^+、K^+ 离子的转运是通过细胞膜上的 Na^+-K^+ 泵蛋白，并且由 ATP 直接功能来实现的。动物细胞靠 ATP 水解功能驱动 Na^+-K^+ 泵工作，结果造成质膜两侧的 Na^+、K^+ 分布不均匀，有助于维持动物细胞的渗透平衡。细胞的生命活动需要这种特定和相对稳定的离子浓度。

（三）胞吞作用与胞吐作用

真核细胞通过胞吞作用和胞吐作用完成大分子与颗粒性物质的跨膜运输，例如蛋白质、核酸、多糖、胆固醇、微生物和细胞碎片等物质的运输。无论是胞吞作用还是胞吐作用，此过程中都涉及膜的融合与断裂，而且与主动运输一样需要消耗细胞的代谢能量。

二、物质的合成与分解

（一）蛋白质的合成与分解

1. 多肽链的生物合成过程

自然界拥有多于 10^{10} 种不同的蛋白质，构成这些多肽的基本单位仅是 20 种氨基酸。目前已经知道，多肽链上氨基酸的排列次序最终是由 DNA 上核苷酸排列顺序决定的。DNA 上的遗传信息需要通过转录传递给 mRNA，mRNA 再将信息从核内运送到胞质中，然后按照遗传密码的翻译准则指导合成新的蛋白质。因此 mRNA 才是蛋白质合成的直接模板。

放射性同位素标记实验证明肽链合成是从 N-端向 C-端进行的。蛋白质的生物合成过程基本可以分为四个阶段，即氨基酸活化、肽

链合成起始、肽链延伸和肽链合成终止。

肽链合成开始前，氨基酸必须获得能量使羧基活化后，才能从形成的氨基酸-AMP-酶复合物上转移到相应 tRNA 上，形成氨酰-tRNA。mRNA 也在起始因子的作用下与核糖体小亚基结合。氨酰-tRNA 凭借 tRNA 自身的反密码子与 mRNA 上的密码子识别，最后它们一起与核糖体大亚基结合形成起始复合物，并占据其肽酰位点 P 位，另一个 A 位准备接受另一个氨酰-tRNA，为肽链延伸做准备。肽酰基从 P 位转移到 A 位，形成新肽键，P 位点的 tRNA 脱落，A 位点的 tRNA 携带一个二肽。同时核糖体沿 mRNA 5′→3′做相对移动，肽链逐渐延伸。当识别 mRNA 上的终止信号，肽链-tRNA 酯键水解，促使新合成的肽链释放。多肽链合成是从 N-端向 C-端进行的，而且延长速度极快。

大肠杆菌新合成的多肽，一部分停留在胞质中，一部分则被送到质膜、壁膜空间或胞外。真核细胞中游离核糖体合成的多肽只供装配线粒体及叶绿体膜，而附着核糖体新合成的多肽被 N-端部分的信号肽控制而进入内质网腔。在内质网腔中多肽链主要是被修饰，这些修饰作用包括：N-端信号肽的切除、二硫键的形成，多肽链空间折叠和糖基化作用。然后修饰产物被运送到高尔基体作进一步修饰与调整，合成溶酶体蛋白、分泌到胞外的蛋白和构成质膜的蛋白。

2. 蛋白质降解和氨基酸分解

高等动物需要不断从外界摄取蛋白质以维持组织细胞生长、更新和修复的需要。外援蛋白质在消化道内经过胃液和肠液、胰液中的蛋白酶消化后，形成游离的氨基酸，吸收入血液，供给细胞合成自身蛋白质的需要。

氨基酸的分解代谢主要在肝脏进行。机体内氨基酸代谢的脱氨基作用，脱酰胺基作用将氨基转变为氨。氨是生物机体中的有毒物质，除一部分用于生物合成外，多余的氨转变成尿素（尿酸）排出体外。脊椎动物体内的 20 种氨基酸，分别在 20 种不同的多酶体系作用下，通过各异的细胞氧化分解途径，进入三羧酸循环，最终氧

化为 CO_2 和 H_2O。

（二）糖的合成与分解

许多植物、光合细菌可以利用光合作用将 CO_2 和 H_2O 合成糖。动物缺乏这种能力，因此，这部分我们主要讲动物体内糖的代谢。糖代谢受神经、激素的调节控制。它的代谢紊乱会引起各种疾病，如半乳糖血症、糖尿病、低血糖症等，因此对糖代谢的研究有利于疾病的防治。

1. 糖的异生与糖原合成

糖的异生是指从非糖物质合成葡萄糖的过程。例如，丙酮酸、甘油、乳酸及某些氨基酸等非糖物质都可以转化成葡萄糖。在机体饥饿、剧烈运动造成糖原下降后，糖异生对于维持血糖浓度、满足组织对糖的需要是十分重要的。

糖异生途径中，从丙酮酸形成葡萄糖需要消耗 6 分子 ATP 和特殊调控酶的帮助。1-磷酸葡萄糖在尿苷二磷酸葡萄糖（UDPG）焦磷酸化酶催化下生成 UDPG，然后在糖原合成酶催化下合成新糖原。

2. 糖类的分解代谢

植物光合作用产生的淀粉是动物糖类的主要来源。在动物的消化器官中，淀粉经唾液淀粉酶、α-淀粉酶、寡糖酶、β-半乳糖苷酶等水解酶的作用水解成单糖，经小肠黏膜细胞吸收进入血液。肝脏、肌肉中的糖原相继在糖原磷酸化酶、去分支酶、变位酶的催化下水解成葡萄糖，进入血液循环。

葡萄糖在动、植物，微生物细胞质中一般都经过糖酵解途径，生成丙酮酸和 ATP。在有氧的情况下将酵解产生的丙酮酸氧化脱羧形成乙酰 CoA。乙酰 CoA 经一系列氧化、脱羧，最终生成 CO_2 和 H_2O 并产生能量的过程称为三羧酸循环（又称柠檬酸循环，简写为 TCA 循环）。

（三）脂类合成与分解

脂肪酸是生物体重要能源，在动物的脂肪组织、植物种子或果实中大量储藏。脂类的生理作用在上一章已做过介绍，脂类物质的

代谢紊乱与人类的动脉粥样硬化、脂肪肝、酮尿症等疾病关系密切。

1. 脂类的合成

生物体中脂类的合成十分活跃，特别是在高等动物的肝脏、脂肪组织和乳腺中占优势。脂肪酸的合成是在胞液中，需 CO_2 和柠檬酸参加，脂肪酸的碳源来自糖酵解产生的乙酰 CoA。细胞内的脂肪酸和甘油分别以活化的形式（脂酰 CoA 和 3-磷酸甘油）参与三酯酰甘油的生物合成，以此再衍生出其他脂类物质。

2. 脂类的消化和分解代谢

动物食物中的脂类物质的消化主要在十二指肠中进行。脂肪和氨基酸可刺激十二指肠分泌肠促胰酶素和胆囊释放收缩素。前者促使胰脏分泌酶原颗粒在小肠内转变为脂肪酶，后者促使胆囊收缩，引起胆汁分泌。在胰脏脂肪酶的作用下，甘油三酯、少量胆固醇和磷脂被水解为游离脂肪酸、胆固醇和甘油 2-单酯等产物。甘油通过血液运至肝脏，经糖酵解途径转化成丙酮酸继续氧化，或经糖异生途径生成葡萄糖。脂肪酸在细胞质中被活化形成脂酰 CoA，然后进入线粒体内氧化，其中脂肪酸的 β-氧化作用最终使大部分脂肪酸形成乙酰 CoA，进入三羧酸循环，最终形成 CO_2 和 H_2O 并产生大量的能量物质 ATP。

（四）核酸的合成与分解

1. DNA 的合成复制

生物体的遗传信息通过染色体 DNA 的复制，由亲代传递给子代。原核生物的染色体和质粒 DNA，真核生物的细胞器 DNA 都是双链环状分子。真核生物染色体 DNA 是线性双链分子。基因组上能独立进行复制的单位称为复制子，每个复制子都有控制复制起始的位点。环状 DNA 分子往往都在一个固定的起点开始复制，复制方向大多是双向的。线性 DNA 分子上含有许多复制起点，因此是多复制子。病毒 DNA 多种多样，复制方式也多样。

生物体内的 DNA 分子通常处于负超螺旋状态，在 DNA 复制时首先需要两条链解螺旋并且打开成单链作为模板，拓扑异构酶和

DNA 解螺旋酶共同完成这项准备工作。由于解开后的 DNA 分子两条链是反向平行的，一条链的走向为 5′→3′，另一条链为 3′→5′。但是已知 DNA 聚合酶的合成方向都是 5′→3′，日本学者冈崎等揭示了 DNA 的不连续复制模型。以复制叉向前移动的方向为标准，一条模板链是 3′→5′走向，新的 DNA 链能以 5′→3′方向连续合成，称其为前导链；另一条模板链是 5′→3′走向，其上的 DNA 也是从 5′→3′方向合成，但是与复制叉的方向正好相反，随着复制叉不断移动，合成许多不连续的片段，最后连成一条完整的 DNA 链。这个过程中除了需要 DNA 聚合酶，还有四种脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP），四种核糖核苷三磷酸（NTP）和引物合成酶。因为 DNA 合成开始时需要引物，引物合成酶能够以 DNA 为模板从 5′→3′方向先合成一小段 RNA 链（RNA 引物），然后 DNA 聚合酶才能从 RNA 引物的 3′-OH 端开始合成新的 DNA 链。

1970 年在致癌 RNA 病毒中发现逆转录酶，说明遗传信息可以由 RNA 传递给 DNA，即以 RNA 为模板，按照 RNA 上的核苷酸顺序合成 DNA，这个过程称为逆转录。

2. RNA 的生物合成

在 DNA 指导的 RNA 聚合酶作用下，以 DNA 为模板合成 RNA，这个过程称为转录。RNA 聚合酶无需引物，它能直接在 DNA 模板上合成 RNA 链，而且合成方向也是 5′→3′，与 mRNA 序列相同的 DNA 链为正义链，互补的链为反义链。需要说明的是，RNA 的转录模板是 DNA 链上的一些特定区域，每个特定区域可称为一个转录单位。一个转录单位可以是一个基因，也可以是多个基因。每个转录单位的转录起始是由 DNA 的启动子区控制的，转录终止则由终止子来控制。启动子是 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段 DNA 序列。提供转录终止信号的 DNA 序列称为终止子。

细胞内，由 RNA 聚合酶合成的原初转录物往往需要经过一系列的变化，包括链的裂解、3′端与 5′端的切除和特殊结构的形成、碱基修饰和糖苷键的改变、拼接等过程，最后转变为成熟的 RNA

分子，此过程称为转录后加工。例如，真核生物由原初转录物（hnRNA）转变成 mRNA 的加工过程包括：5′端形成特殊的帽子结构（$m^7G^{5'}ppp^{5'}NmpNp$-）；3′端切断并加上多聚腺苷酸（polyA）尾巴；通过拼接出去转录过来的内含子序列；链内部核苷被甲基化。

3. 核酸和核苷酸的分解代谢

核酸是由许多核苷酸以 3′,5′-磷酸二酯键连接而成的生物大分子。核糖核酸酶或脱氧核糖核酸酶可以水解连接核苷酸之间的磷酸二酯键，使其成为游离的核苷酸。核苷酸酶或磷酸单酯酶催化核苷酸水解，脱下磷酸成为核苷。核苷经核苷酶作用分解为嘌呤碱或嘧啶碱和戊糖。

不同种类的生物分解嘌呤碱和嘧啶碱的能力不一样，因而代谢产物亦各不相同。人和猿类、鸟类、某些爬虫和昆虫等以尿酸作为嘌呤碱代谢的最终产物，其他生物则还能进一步分解尿酸，最后形成二氧化碳和水。具有氨基的嘧啶一般脱氨形成尿嘧啶，然后尿嘧啶开环水解成二氧化碳、氨和 β-丙氨酸。

三、能量的合成与利用

（一）能量的合成—— 光合作用

光合作用是自然界将光能转变为化学能的主要途径。长期以来，人们以为光合作用的产物只是糖类和氧，而蛋白质和脂肪等有机物都是植物体利用糖类再度合成的。事实上，一部分蛋白质和脂肪也是光合作用的直接产物。因此，光合作用是指绿色植物或光合细菌利用光能将 CO_2 转化成有机化合物的过程。绿色植物是以 H_2O 为电子供体还原 CO_2，同时产生 O_2。光合细菌（如硫细菌等）利用其他化合物代替水作为电子供体还原 CO_2，但是不产生 O_2。叶绿体是绿色植物光合作用的场所，反应过程根据需光与否分为光反应阶段和暗反应阶段。光反应阶段和暗反应阶段是一个整体，在光合作用的过程中，二者是紧密联系、缺一不可的。

1. 光反应

光反应是光合作用的第一个阶段，需要光的参与，反应场所在

叶绿体的类囊体膜上。光反应是由光合色素将光能转变成化学能并形成 ATP 和 NADPH 的过程。

(1) 原初反应

原初反应包括光能的吸收、传递和转换，即聚光色素分子将捕获的光能传递至反应中心，在反应中心发生最初的光化学反应，使光能转变为电能的过程。

叶绿体中接受光能的色素分子有叶绿素 a、叶绿素 b、胡萝卜素、叶黄素、藻胆素等，它们共同构成光系统。其中大部分叶绿素 a 和其他所有色素都是聚光色素，它们将吸收的光能都传递给少数的叶绿素 a 分子，这些特化的叶绿素 a 分子既是光能捕捉器，又是光能转换器，具有光化学活性，可将光能转变为电能。它们按照最大吸收峰的不同分为两类：吸收峰为 700nm 的特化叶绿素 a 分子称为 P700，是光系统Ⅰ（PSⅠ）的中心色素；吸收峰为 680nm 者称为 P680，是光系统Ⅱ（PSⅡ）的中心色素。当太阳光照射到类囊体膜上时，能量同时被 PSⅠ和 PSⅡ的聚光色素捕捉，并分别传递给各自的反应中心色素 P700 和 P680，两个反应中心的电子同时被激发而传递给各自的原初电子受体，开始原初反应。

由聚光色素和反应中心构成了光合作用的基本单位。其中，反应中心由一个中心色素分子 Chl 和一个原初电子供体 D 及一个原初受体 A 组成。Chl 受聚光色素传递的光能激发失去电子，释放出的电子给了 A，此时的 Chl^+ 又从 D 获得电子而恢复原来的状态。这样不断的氧化还原，A 就不断地接受电子，从而完成光能向电能的转换。

(2) 电子传递

实验证明，光合作用的电子传递是在两个不同的光系统中进行的，即由 PSⅠ和 PSⅡ协同完成。两个光系统的合作完成了电子传递、水的裂解、氧的释放和 NADPH 的生成。

P680 位于类囊体膜内侧，被光能激发后，释放的高能电子先由 D 传递给第一个质体醌电子受体 Q_A，然后由 Q_A 转移到第二个

醌电子受体 Q_B，再经质体醌（PQ）、细胞色素 b/f 复合物和质体蓝素（PC）传递到 P700，从而填补了 P700 的电子缺失。而此时 P680 出现了电子缺失，这一缺失则由 H_2O 的电子来补足，H^+ 释放到类囊体腔中产生膜两侧梯度，同时释放 O_2。

P700 位于类囊体膜外侧，它释放的电子被结合在类囊体膜上的电子传递体——铁氧还蛋白（Fd）所接受，并经 Fd 最后传递给电子传递体 $NADP^+$，同时从叶绿体基质中吸收一个 H^+ 而还原为 NADPH。这样，通过两个光系统互相配合，利用所吸收的光能把电子从水传递给 $NADP^+$。

（3）光合磷酸化

电子传递中所产生的 H^+ 进入类囊体腔中，使类囊体内外形成了质子梯度。质子穿过类囊体膜上的 ATP 合成酶复合体上的管道从类囊体腔流向叶绿体基质，同时将能量通过磷酸化而储存在 ATP 中。这一磷酸化过程是在光合作用中发生的，所以称为光合磷酸化。

2. 暗反应

二氧化碳同化是将光反应所生成的 ATP 和 NADPH 中的活跃的化学能，转换为储存在糖类中稳定的化学能的过程。卡尔文循环是碳同化最重要最基本的途径，只有这条途径才具有合成淀粉等产物的能力。卡尔文循环固定 CO_2 的最初产物是 3-磷酸甘油酸，所以也称 C_3 途径。每循环一次只能固定一个 CO_2 分子，循环六次才能把 6 个 CO_2 分子同化成一个己糖分子。

除了卡尔文循环，某些热带植物或亚热带起源的植物如甘蔗，后来发现玉米、高粱、禾本科等植物中存在着另一独特的固定 CO_2 的途径，它们固定 CO_2 的最初产物是草酰乙酸（四碳化合物），所以称之为 C_4 途径，进行 C_4 途径的植物称为 C_4 植物。这些植物利用 CO_2 的效率特别高，它们的叶肉细胞将吸收进来的 CO_2 经 C_4 途径固定先合成苹果酸，然后通过胞间连丝苹果酸进入叶脉周围的维管束鞘细胞继续进行 C_3 循环途径，由这两类途径共同配合完成 C_4 植物对 CO_2 的净固定。

景天科植物固定 CO_2 的途径是通过景天科酸代谢（CAM），CAM 与 C_4 途径相似，只是在反应途径发生的时间及空间不同。景天科植物晚间吸进 CO_2，白天进行碳同化。

（二）能量的利用—— 呼吸作用

自养生物（包括绿色植物和光合细菌）能将光能转换为有机物中的化学能；异养生物（动物）必须摄取外界的有机物，从中获取能量来供生命活动之需。摄入的有机物质在体内消化、降解成可吸收的小分子物质后，在细胞内通过生物氧化获得化学能。因此将细胞氧化葡萄糖、脂肪酸或其他有机物以获取能量并产生二氧化碳的过程称为细胞呼吸。

1. 有氧呼吸

由于葡萄糖是大多数有机体生命活动的主要能源，了解葡萄糖所含的化学能如何转化成可以被细胞利用的能量形式是十分重要的。葡萄糖进行细胞有氧呼吸的全过程可分为 4 个部分，即糖酵解、丙酮酸氧化脱羧、三羧酸循环（又叫柠檬酸循环）和电子传递过程。

（1）糖酵解　前面已经介绍了糖酵解的概念。糖酵解是糖类在细胞内进行不完全分解的复杂过程，主要在细胞质内进行，是一种效率很低的放能反应。一分子葡萄糖降解生成 2 分子丙酮酸，2 分子 NADH，净得 2 个 ATP 分子。

（2）丙酮酸氧化脱羧　丙酮酸分子氧化脱羧生成乙酰 CoA 和 NADH，这是连接糖酵解和三羧酸循环的中心环节，在线粒体中进行。

（3）三羧酸循环　三羧酸循环是乙酰 CoA 与草酰乙酸合成柠檬酸，经过一系列反应再回到草酰乙酸的过程。每一次循环都净剩 3 个 NADH，1 个 $FADH_2$，1 个 ATP 和 2 个 CO_2 分子。三羧酸循环在动、植物和微生物细胞中普遍存在，不仅是糖分解代谢的主要途径，也是脂肪、蛋白质分解代谢的最终途径，具有重要的生理意义。为此，1953 年 Krebs 获得诺贝尔奖，并被称为 ATP 循环之父。

（4）电子传递过程

葡萄糖经过糖酵解和柠檬酸循环而全部被氧化，氧化所产生的能量一部分储存到 ATP 中，一部分还保留在还原型辅酶 NADH 和 $FADH_2$ 中所接受的高能电子中，这些高能电子怎样把能释放出来而转移给 ATP 呢？

线粒体内膜上存在着一系列电子传递体，如 FMN、CoQ 和各种细胞色素等，分子氧是电子传递链中最后的电子受体。糖酵解和柠檬酸循环产生的 NADH 和 $FADH_2$ 中的高能电子，沿着电子传递链上各电子传递体的氧化还原反应而从高能水平向低能水平顺序传递，最后到达分子氧。同时电子传递过程把 H^+ 带出基质进入膜间隙，使得膜间隙与基质形成 H^+ 电位差。在此电位差推动下，H^+ 通过内膜上的跨膜通道蛋白进入基质，其能量通过磷酸化而被储存到 ATP 中。这样高能电子所释放的能量就转移给了 ATP。这里的磷酸化作用和氧化过程的电子传递是紧密相关的，称为氧化磷酸化。

一个 NADPH 分子经传递链后可积累 6 个质子，因而共产生 3 个 ATP 分子；而一个 $FADH_2$ 分子经过电子传递链后，只积累 4 个质子，因而只生成 2 个 ATP。一个六碳葡萄糖分子酵解产生 2 分子三碳丙酮酸，因此每分子葡萄糖经酵解、氧化脱羧、三羧酸循环及氧化磷酸化共可以产生 $2 + 3 \times (2 + 2) + (9 + 2 + 1) \times 2 = 38$ 个 ATP 分子。某些组织，如骨骼肌、脑组织葡萄糖酵解产生的 NADH 进入线粒体时要通过甘油磷酸穿梭系统，然后在线粒体中重新氧化成磷酸二羟丙酮（丙酮酸的前体）。3-磷酸甘油醛脱氢酶的辅基是 FAD，只产生 2 分子 ATP，在这些组织中葡萄糖完全氧化只产生 36 个 ATP 分子。

糖类、脂肪和蛋白质的合成途径各不相同，但分解途径则有共同之处，即都要参加三羧酸循环，最后被氧化成 CO_2 和 H_2O，同时在线粒体内膜上进行电子传递，释放出能量。但是一个六碳的脂肪酸分子通过 β-氧化和三羧酸循环，可以产生 44 个 ATP 分子，而且脂肪不溶于水，可以浓缩在细胞中作为动物冬眠和鸟类迁徙的能源物质，因此动物储存脂肪比糖原更合适。

2. 无氧呼吸

所有有机体从葡萄糖酵解到形成丙酮酸的途径十分相似，而以后的途径却因为有氧与否变得各不相同。在有氧条件下丙酮酸进入三羧酸循环，最后氧化成 CO_2 和 H_2O，否则就进行无氧呼吸。

（1）酒精发酵

酵母菌或其他微生物中，丙酮酸经丙酮酸脱羧酶的催化，脱羧变成乙醛，继而在醇脱氢酶的催化下，由 NADH 还原形成乙醇和 2 个 ATP 分子，同时释放 CO_2。

（2）乳酸发酵

某些厌氧乳酸菌或肌肉由于剧烈运动而造成暂时缺氧状态，或由于呼吸、循环系统障碍暂时供氧不足时，丙酮酸接受 3-磷酸甘油醛脱氢酶形成的 NADH 上的氢，在乳酸脱氢酶的催化下，形成乳酸。

第三节　细胞的分裂与分化

一个有机体从受精卵发育成为一个成熟的个体，组成身体的细胞必然在数量上增加，同时在结构和功能上发生变化。细胞的分裂是生物体的重要生命特征，是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础。

一、细胞周期与细胞分裂

（一）细胞周期的概念

从一次细胞分裂结束开始，直到下一次细胞分裂结束为止的全过程，称为细胞分裂周期。一个细胞周期可以人为地划分为先后连续的 4 个时期，G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期。但并不是所有细胞的分裂过程都经历这几个时期，例如受精卵进行卵裂时细胞周期极短，几乎只有 S 期和 M 期。

（二）细胞周期中发生的主要事件

1. G_1 期

G_1 期是细胞周期的第一阶段。新生成的子代细胞在这个时期开始合成细胞生长所需要的各种蛋白质、糖类、脂类、RNA 和核

糖体的合成，但不合成 DNA。在 G_1 期有些细胞会暂时离开细胞周期，停止细胞分裂，这些细胞称为静止期细胞，或 G_0 期细胞。一旦 G_0 期细胞得到信号指使，会快速返回细胞周期，分裂增殖。G_0 期细胞的生成和它们重返细胞周期的机制研究，已越来越受到人们的重视，这不仅涉及对细胞分化和细胞增殖过程的探讨，而且对生物医学如肿瘤发生和治疗、药物设计和药物筛选等，都具有重要的指导意义。在机体内有一些细胞，由于分化程度很低，一旦生成后终生不再分裂，这些细胞称为终末分化细胞。如大量的横纹肌细胞、多核型白细胞等，目前这些细胞被认为是 G_0 期细胞。

2. S 期

即 DNA 合成期。新的组蛋白也是在 S 期合成的。

3. G_2 期

DNA 复制完成后，细胞即进入 G_2 期。此时 DNA 的含量已经增加一倍，其他结构物质和相关的亚细胞结构做好了进入 M 期的准备。

4. M 期

M 期即细胞分裂期。真核细胞的分裂方式有两种，即有丝分裂和减数分裂。

（三）有丝分裂

有丝分裂普遍见于真核生物体细胞的增殖。有丝分裂的特征之一是分裂过程中有纺锤体出现。在分裂前期，细胞核内染色质开始浓缩，每条染色体含有两条染色单体在光镜下已经可以分辨。随后进入前中期，核相破裂，核骨架结构发生剧烈变化，染色体进一步浓缩形成明显的 X 形结构，纺锤体牵引染色体向赤道板方向运动。在分裂中期，所有染色体移动排列在赤道板上，染色体进一步缩短变粗，显示出本物种所特有的数目和形态，因此这时期适于对染色体的形态和数目进行观察。在有丝分裂的后期，两条染色体单体从着丝点分开，成为两个染色体，当染色单体到达两极，即进入末期。移动到细胞两极的染色体解旋为染色质，核膜、核仁重新出现。细胞质一分为二，形成两个子细胞。动物细胞一分为二的方式

是细胞膜向中间凹陷，形成环状缢裂，最后断裂为两个子细胞。植物细胞则在细胞赤道板位置形成细胞板，细胞板向四周扩展形成新的细胞壁，把细胞一分为二。

（四）减数分裂

减数分裂是一种特殊的有丝分裂，仅发生于有性生殖细胞形成过程中的某个阶段，也称成熟分裂。减数分裂的主要特点是DNA复制一次，细胞分裂两次，这两次分裂分别称为减数分裂期Ⅰ和减数分裂期Ⅱ。在两次分裂之间，还有一个短暂的分裂间期。两性生殖细胞经过减数分裂，各自的染色体数目减少一半。再经过受精使染色体数目恢复到体细胞数目。减数分裂的意义在于，既有效地获得父母双方的遗传物质，保持后代的遗传性，又可以增加更多的变异机会，增加生物的多样性，增强生物适应环境变化的能力。

1. 减数分裂前间期

减数分裂之前的间期阶段也可以人为地划分为 G_1 期、S期和 G_2 期三个时期。此间期阶段的最大特点在于S期持续时间较长，细胞核体积增大，染色体凝集。一般认为这些与染色体和基因重组有关。

2. 减数分裂期Ⅰ

减数分裂期Ⅰ与有丝分裂有许多相似之处。其过程也可以人为地划分为前期Ⅰ、前中期Ⅰ、中期Ⅰ、后期Ⅰ、末期Ⅰ和胞质分裂Ⅰ等6个阶段，但又有其鲜明的特点。其中，前期Ⅰ持续时间较长，此期间进行染色体配对和基因重组，也合成一定量的RNA和蛋白质。根据细胞形态变化，将前期Ⅰ人为地划分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期五个阶段。细线期发生染色质凝集，折叠螺旋化，但两条染色单体的臂并不分离。偶线期主要发生同源染色体配对，又称为配对期。粗线期发生等位基因之间部分DNA片段的交换和重组，此外还合成减数分裂专有的组蛋白，全部置换体细胞的组蛋白部分。双线期中的同源染色体四分体结构清晰可见，RNA转录活跃，蛋白质及其他物质合成等，许多动物，尤其

是鱼类、两栖类、爬行类和鸟类的雌性动物，染色体去凝集成一种特殊的巨大染色体结构，成为灯刷染色体。终变期时染色体重新开始凝集，形成短棒状结构。

3. 减数分裂期Ⅱ

第二次减数分裂过程与有丝分裂过程非常相似，即经过分裂前期Ⅱ、中期Ⅱ、后期Ⅱ、末期Ⅱ和胞质分裂Ⅱ五个过程。经过第二次减数分裂，共形成4个子细胞。在雄性动物中，4个子细胞大小相似，将发育为4个精子。在雌性动物中，第一次分裂为不等分裂，大的称为卵母细胞，小的称为第一极体。第一极体很快死亡解体，或分裂为没有任何功能的两个细胞。卵母细胞第二次减数分裂也是不等分裂，其结果是产生一个卵细胞和一个第二极体。第二极体也没有功能，很快解体。最后，雌性动物减数分裂仅产生一个有功能的卵细胞。

二、细胞全能性

细胞全能性是指细胞经分裂和分化后仍具有产生完整有机体的潜能或特性。受精卵具有发育成完整个体的全能性。现在证明，高度分化的植物细胞仍具有全能性，利用这一特性可广泛的应用在植物基因工程的实践中。动物细胞的细胞核含有保持本物种遗传性的全套基因，所以高度分化细胞的细胞核仍具有全能性，1997年克隆羊多莉的诞生有力地证明了这一点。

一般来说，高等动物细胞随着胚胎的发育，分化程度的不断提高，细胞发育潜能逐渐变窄，由全能性细胞转化为多能和单能造血干细胞。近年来，体外胚胎干细胞诱导分化生成造血干细胞、神经细胞、肌肉细胞等研究结果，不仅深化了对细胞全能性和细胞分化机制的了解，而且在组织与器官移植的组织工程的研究与实践都具有重要意义。

三、细胞分化

细胞分化是自然界普遍存在的一种生命现象。每个生物体都由多种多样的细胞构成的，不同的细胞具有不同的结构和功能，但它们都是由一个细胞，即受精卵分化而来的。

（一）细胞分化的基本概念

在个体发育中，由一种相同的细胞类型经细胞分裂后逐渐在形态、结构和功能上形成稳定性差异，产生不同的细胞类群的过程称为细胞分化。细胞分化使多细胞生物中细胞功能趋向专门化，如支持、运输、营养、保护、运动及繁殖等，这有利于提高各种生理功能的效率。没有细胞的高度分化，就无法出现执行不同功能的细胞，复杂的生命个体也就无法生存下去。因此，分化是生物正常发育的基础。

细胞分化在个体发育中是不可逆的，而且十分稳定，并能传递给后代，如黑色素细胞在体外培养 30 多代后仍能合成黑色素。但是在一定条件下，这种稳定和持久是相对的，所以说分化又是可逆的，例如 Stewar 等在人工培养条件下成功地用胡萝卜韧皮部细胞培育出一株完整的胡萝卜个体。

（二）细胞分化是基因选择性表达的结果

细胞的特性，无论形态还是机能，都是由蛋白质决定的，而蛋白质的合成又是由基因决定的。构成生物体的每个细胞的遗传物质并没有不同，但在生长发育过程中，为什么分化出不同类型的细胞呢？现代分子生物学的证据表明，细胞分化是由于基因选择性地表达各自特有的专一性蛋白质而导致细胞形态、结构与功能的差异。

分化细胞基因组中所表达的基因大致可分为两种基本类型：一类是管家基因，另一类称为组织特异性基因，或称奢侈基因。管家基因是指所有细胞中均要表达的一类基因，其产物是对维持细胞生命活动所必需的，如糖酵解基因、核糖体蛋白基因等。而组织特异性基因是指不同的细胞类型进行特异性表达的基因，其产物赋予细胞各种类型细胞特异的形态结构特征与特异的生理功能，如胰腺细胞特异表达胰岛素基因、眼部细胞特异表达晶状体蛋白基因等。因此，细胞分化是指组织特异性基因在时间与空间上的差异表达。这种差异表达不仅涉及基因转录水平和转录后加工水平上的精确调控，而且还涉及染色体和 DNA 水平，翻译和翻译后加工与修饰水平上的复杂而严格的调控过程。

四、自由基与衰老

（一）衰老的特征

衰老是生物在生命过程中，机体的形态、结构、功能逐渐衰退的总现象，是不可避免的自然规律。细胞的衰老与机体的衰老密切相关，因为细胞是生物体的基本组成单位，机体的衰老事实上就是细胞衰老的结果。细胞衰老时表现的特征如下。

① 细胞膜流动性下降。

② 细胞核异常，表现为核固缩，染色质凝集程度增加。

③ 细胞器降解：线粒体数目减少，氧化磷酸化功能下降；内质网排列紊乱，物质运转及信息传递障碍；核糖体脱落，蛋白质合成停止；高尔基体崩溃，溶酶体形成自噬小泡。

④ 细胞内水分减少，细胞脱水，体积减小。

（二）细胞衰老的自由基理论

英国 Harman 于 1956 年率先提出自由基与机体衰老和疾病有关。半个世纪以来，科学家们致力于分析衰老发生的原因及导致衰老变化的机制，提出很多种有关衰老起因的观点或学说。如衰老的遗传程序说、细胞大分子合成错误成灾论、自由基理论、线粒体损伤论和细胞衰老的端粒假说等。由于衰老是一个十分复杂的生命现象，又受到多种因素包括环境因素和体内因素的影响，任一角度的阐述都难以使衰老机理得到圆满解释。目前医学界最关注的衰老理论是自由基理论（free radical theory）。

1. 自由基及其性质

自由基是指那些在原子核外层轨道上具有不成对电子的分子或原子基团。所谓未成对电子，就是指那些在原子或分子轨道中未与其他电子配对而独占一个轨道的电子。如 AB 两个原子各提供一个电子通过共价键形成一个分子 A：B，这两个电子是配对的。如果在化学反应中发生了均裂，A 和 B 各带走一个电子，它们就是未成对电子。

$$A：B \rightarrow A\cdot + \cdot B$$

A·和·B 就称为自由基。

在正常条件下，自由基是在机体代谢过程中产生的，人类在吸收氧气、消耗热量或者分解葡萄糖时，会产生自由基（也叫活性氧或游离基）。此外，空气污染、辐射、某些化学物质等都可影响自由基的产生。自由基是一类高度活化的分子。当这种分子与其他物质反应时，力图得到电子，而对细胞及组织产生十分有害的生物效应。老年人皮肤上的老年斑就是自由基对细胞破坏的见证。

2. 衰老的自由基学说

1955 年美国科学家 Harman 在美国的原子能委员会提出衰老的自由基学说，题目是“衰老：根据自由基和放射化学提出的理论”。这一学说是建立在实验研究的基础上的，核心内容有三条：①衰老是由自由基对细胞成分的有害进攻造成的；②衰老自由基理论的实质就是衰老的氧自由基理论；③维持体内适当水平的抗氧化剂和自由基清除剂水平可以延长寿命和推迟衰老。

3. 自由基在生物体内的作用

在正常情况下，自由基具有调节细胞间的信号传递和细胞生长，抑制病毒和细菌的作用。但是当体内自由基过多时，就会对人体造成伤害。自由基由于活性强，容易与细胞内的生物大分子发生反应：它们能使质膜中的不饱和脂肪酸氧化，从而使膜内酶活性破坏、膜蛋白变性、膜脆性增加、膜结构发生改变，膜的运输功能紊乱以至丧失；它们还能将蛋白质中的巯基氧化而造成蛋白质发生交联、变性，使酶失活；另外它们还能使 DNA 链断裂、交联、碱基羟基化、碱基切除等，从而对 DNA 造成损伤。由此导致的生理变化有：降低免疫功能、引发糖尿病及各种合并症、动脉硬化及心脑血管病症和使机体处于亚健康状态。因此有人认为在衰老的原因中，99％是由自由基造成的。

4. 哪些情况导致自由基的产生

（1）加工食品　部分食品添加剂在肝脏解毒过程中产生自由基攻击肝脏，包括残留农药、酒精等。

（2）吸烟　香烟除了含有焦油、尼古丁等有害物质之外，还含有自由基——过氧化氢。

（3）精神压力　过度兴奋时或过度紧张时，体内会分泌某种激素（去甲肾上腺素和肾上腺素），这类激素在分解过程中会产生自由基。

（4）紫外线照射　紫外线照射在皮肤表面时也产生自由基，引起皮肤癌。

（5）剧烈运动　进行适量的有规律的运动时，体内自由基和脂质过氧化产物并不增加。但是当进行剧烈运动时，体内自由基的生成就会增加。因为运动时机体相对缺氧，细胞质内钙离子浓度增加、体温增加、儿茶酚胺水平升高，运动中和运动后血红蛋白的自主氧化速度增加等均可引起自由基产生增加。运动可增加氧利用的速率，通过电子传递链的电子流也就可增加自由基的产生。科学发现，运动到精疲力竭后肝脏和肌肉的自由基产生增加 2～3 倍。而在自由基增加的同时，大强度运动也消耗机体的抗氧化物质（维生素 C、维生素 E），从而降低机体的抗氧化能力，也就是削弱了机体的清除自由基的能力。这两方面作用结合到一起，使健身运动不仅达不到健身的目的，相反还会损害健康。

（6）免疫力下降　可能是产生过量自由基的最主要原因。免疫功能降低和酸性体质有着密切联系。因为人体正常的内环境是呈弱碱性的，所有的免疫细胞也在 pH 值为 7.35～7.45 的弱碱性环境中活性最强。而过量食入高糖、高脂肪类食物形成的酸性体质会使 pH 值长期低于 7.35，免疫细胞的活性必然会降低，免疫功能因此下降，从而滋生大量的自由基。

5. 自由基清除剂

体内不断产生自由基，但并未对身体造成严重后果，原因是体内存有清除氧自由基的酶系统，二者保持相对平衡状态。超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶、过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化酶（GSH-px）都是体内有效的自由基清除剂。

实验证明，一些名贵药材具有清除自由基的功能。清除氧自由基的药物在体内通过清除超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢、单线态氧，减少丙二醛的生成，抑制脂质过氧化，增加酶的活性，稳定

靶细胞膜，补充 SOD、过氧化物酶及增强 SOD 活性而发挥作用。常用药物有西洋参、党参、白芍、丹皮、干姜、丹参、红参、灵芝、枸杞子等。

维生素类物质，如维生素 A 、维生素 C 和维生素 E 都是强抗氧化剂和自由基清除剂。

多糖类物质，如壳聚糖、人参多糖、茶叶多糖、紫菜多糖、米糠多糖、刺五加多糖、黄芪多糖、苍术多糖、黑木耳多糖、银耳多糖、虫草多糖、金针菇多糖等。它们分别通过直接或间接地清除体内过剩的氧自由基而起到增强体质和延缓衰老的作用。

茶多酚对超氧阴离子与过氧化自由基的清除率可达 98%以上，在一定范围内呈显著的量效关系，其效果优于经典的天然抗氧化剂维生素 E 和维生素 C。

此外，人参皂苷、葡乐安、碧萝芷、蜂花粉 、芦荟提取物 、银杏粉 、大蒜素 、葛根提取物等也具有保护体内活性酶不被自由基破坏，具有抗氧化和清除自由基的功能。

第四节　细胞凋亡

虽然在半个世纪以前科学家就观察到正常生长发育过程中有细胞凋亡的现象存在，但一直不了解其生物学意义。直到 20 世纪 90 年代初，由于分子肿瘤学研究发现细胞凋亡与肿瘤的发生、发展以及与肿瘤治疗中的细胞死亡有密切关系，才引起极大重视。现在已经明确：细胞凋亡在肿瘤发生、肿瘤治疗、胚胎发育、免疫反应、神经系统发育、组织细胞代谢等过程中起重要作用。目前，细胞凋亡研究已成为当代生命科学最热门的领域之一，取得的进展拓宽并丰富了人们对生命现象的认识。

一、细胞凋亡的概念

细胞凋亡（apoptosis）又称程序性细胞死亡， 是细胞对环境的生理性病理性刺激信号、环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程，是一种在特定时空主动发生的、受基因严密调控的细胞逐渐死亡现象。

细胞凋亡与细胞坏死不同。细胞凋亡不是一件被动的过程，而是主动过程，它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用；它并不是病理条件下，自体损伤的一种现象，而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。细胞发生凋亡时，就像树叶或花的自然凋落一样。例如蝌蚪变成青蛙，昆虫的变态，高等哺乳类动物子宫内膜脱落、指间蹼的消失、颚融合、视网膜发育以及免疫系统的正常发育都伴随大量细胞凋亡，机体无炎症反应，而且对整个机体的发育是有利和必须的。细胞坏死是细胞受到强烈理化或生物因素作用引起细胞无序变化的死亡过程，表现为细胞胀大，胞膜破裂，细胞内容物外溢，核变化较慢，DNA 降解不充分，引起局部严重的炎症反应。凋亡与坏死的最终结果虽然极为相似，但它们的过程与表现却有很大差别。

二、凋亡相关的基因和蛋白

细胞凋亡的调控涉及许多基因，包括一些与细胞增殖有关的原癌基因和抑癌基因。

（一）Caspase 家族

凋亡蛋白质酶是一类半胱氨酸蛋白质酶，具有特异性水解底物分子天冬氨酸（Asp）残七 C 端肽键功能，所以命名为 caspase (cysteine aspartate-specific protease)，是近年随着凋亡研究的深人而发现的重要凋亡分子。迄今已有 13 个分子得到命名，分别为 caspase-1～caspase-13，如 caspase-3、caspase-6、caspase-7，它们可直接降解胞内的结构蛋白和功能蛋白，引起凋亡。caspase-8、caspase-9，受到信号后，能通过自剪接而激活，然后引起 caspase 级联反应，如可依次激活 caspase-3、caspase-6、caspase-7。

细胞中还具有 caspase 的抑制因子，属于一个庞大的蛋白家族，与 caspase 结合，抑制其活性。

（二）Apaf-1

Apaf-1 被称为凋亡酶激活因子-1（apoptotic protease activating factor-1），在线虫中的同源物为 ced-4，在线粒体参与的凋亡途径中具有重要作用，该基因敲除后，小鼠神经细胞过多，脑畸形

发育。Apaf-1 具有激活 caspase-3 的作用，而这一过程又需要细胞色素 c（Apaf-2）和 caspase-9（Apaf-3）参与。Apaf-1/细胞色素 c 复合体可以召集 caspase-9，形成凋亡体，从而激活 caspase-3 启动 caspase 级联反应。

（三）Bcl-2 家族

Bcl-2 为凋亡抑制基因，是膜的整合蛋白，其功能相当于线虫中的 ced-9。现已发现至少 19 个同源物，它们在线粒体参与的凋亡途径中起调控作用，能控制线粒体中细胞色素 c 等凋亡因子的释放。

（四）Fas 基因

由 Fas 基因可编码出分子量为 45kD 的跨膜蛋白，分布于胸腺细胞，激活的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞，巨噬细胞，肝、脾、肺、心、脑、肠、睾丸和卵巢细胞等。Fas 蛋白与 Fas 配体结合后，会激活 caspase，导致靶细胞走向凋亡。

（五）p53 基因

是一种抑癌基因，其生物学功能是在 G 期监视 DNA 的完整性。如有损伤，则抑制细胞增殖，直到 DNA 修复完成。如果 DNA 不能被修复，则诱导其凋亡，研究发现丧失 p53 功能的小鼠胸腺细胞对糖皮质激素诱导的凋亡反应和正常细胞相同，而对辐射诱导的凋亡不敏感。

（六）Myc 基因

近年来发现 Myc 蛋白亦参与诱导细胞凋亡。细胞发生凋亡的速度及其对诱导因素的敏感性均依赖于细胞 Myc 蛋白的含量。尚未成熟胸腺细胞中 Myc 基因的高表达是胚胎胸腺细胞凋亡的诱因。C-myc 基因是 Myc 基因家族的重要成员之一，在许多人类恶性肿瘤细胞和凋亡细胞中都是高表达，作为转录调控因子，一方面它能激活那些控制细胞增殖的基因，另一方面也激活促进细胞凋亡的基因，给细胞两种选择：增殖或凋亡。当生长因子存在，Bcl-2 基因表达时，促进细胞增殖，反之细胞凋亡。

三、细胞凋亡的形态学观察

随着对细胞凋亡的研究和认识的不断深入，对包括肿瘤细胞和组织在内的不同种类病理标本的细胞凋亡的检测已成为一种迫切需要。目前，多种方法已得到较广泛的应用，但形态改变仍是确定细胞凋亡的最可靠的方法。

（一）光学显微镜观察

凋亡细胞的主要特征为核染色质致密深染，形成致密质块，有时可碎裂。在 HE 染色的组织切片中可以看到凋亡细胞常以分散单个形式存在，细胞体积缩小，胞质致密、嗜酸性染色增强，并可形成凋亡小体。

（二）视频视差显微观察

通过相差显微镜可动态观察细胞凋亡的变化过程，尤其是观察细胞表和外形的变化。凋胞与基质分离，胞体变圆、收缩、出泡，有的细胞拉长，出现钉状突起，持续数小时后细胞膜破裂，细胞溶解。但这种连续观察不能用于病理组织。

（三）电子显微镜观察

凋亡细胞的典型形态改变，如胞质的固缩，染色质浓缩成半月形或帽状附于核膜，核的碎裂和凋亡小体形成等，在透射电镜下得到最佳的体现，为凋亡细胞判定提供了最可靠的依据。

（四）流式细胞仪的凋亡观察

流式细胞仪检测凋亡细胞是通过检查其光射特征及荧光参数实行的。细胞凋亡过程中出现的形态改变如细胞皱缩、胞膜起泡、核浓缩和碎裂等可以使光散射特性发生改变。早期凋亡细胞主要表现为前向散射光减弱而右向角散射光增强或不变，前者反映了细胞的皱缩，后者反映了细胞的核逐缩及碎裂。晚期凋亡细胞的前向散射光和右向角散射光均减弱。

细胞凋亡过程中核酸内切酶在 DNA 分子核小体间的降解，导致小分子 DNA 漏出，核 DNA 含量下降，细胞荧光染色后做流式细胞仪分析，可以发现在 DNA 直方图上正常二倍体细胞的 G_0/G_1

峰前出现一个亚二倍体峰代表凋亡细胞。根据此亚二倍体峰可以计算凋亡细胞的百分率。此外，流式细胞术还可以通过测定线粒体膜的电位、溶酶体质子泵的活性及细胞 DNA/总蛋白质比例等方法辨认凋亡细胞。

四、细胞凋亡的生化检测

（一）碘化丙啶（propidium iodide，PI）检测

细胞膜通透性状态的不同是区分细胞凋亡和坏死的一个重要指标，凋亡细胞在进入最终溶解阶段前，胞膜通透性无明显改变，能与 DNA 结合的相对分子质量大的荧光染料（如 PI）不能进入凋亡细胞内，因而不出现 PI 标记的为凋亡细胞。

（二）膜联蛋白（annexin）V 标记

磷脂酰丝氨酸（PS）在细胞凋亡时转至细胞膜外表面，这一改变被认为是特异性的，并且可作为凋亡细胞表面改变的标记。膜联蛋白 V 对 PS 具有高度亲和力，荧光标记的膜联蛋白 V 与细胞表现 PS 结合，再用显微镜或流式细胞仪进行检测，可以观察凋亡过程中细胞膜 PS 的表面化。

（三）DNA 琼脂凝胶电泳法

细胞凋亡时，在内源性核酸内切酶的作用下，DNA 在核小体间被切割成 180～200bp 整数倍的单或寡核苷酸片段，在电泳时表现为特征性的“梯形带”，可以被作为细胞凋亡的一个重要的生化指标。但此方法敏感性不高，大量凋亡细胞同时存在时才出现典型的结果。

（四）DNA 裂解的原位检测

细胞凋亡时，由于 DNA 的裂解，形成单或寡核小体的双链相对分子质量小的片段，并留下带有缺口的大分子量 DNA 片段。此类断裂处可用生物素、地高辛或荧光素标记的核苷酸在 3′-OH 端予以显示。但组织或细胞外理不当时可出现假阳性。

（五）caspase-3 蛋白及其底物的检测

活化的 caspase-3 蛋白仅在凋亡细胞中发现。caspase-3 能够被

人工合成的四肽荧光底物如 DEVD-AMC 水解，释放荧光物质和 AMC，后者在紫外线激发下发出波长为 430～460nm 的荧光，从而测定 caspase-3 的活性。

第五节　癌　细　胞

一、癌细胞的主要特征

（一）脱分化现象

已知肿瘤细胞中表达的胎儿同功酶达 20 余种。胎儿甲种球蛋白（甲胎蛋白）是胎儿所特有的，但在肝癌细胞中表达，因此可做肝癌早期检定的标志特征。

（二）无限增殖

细胞周期失控，不受正常生长调控系统的控制，能持续地分裂与增殖。

（三）细胞表面和黏附性质改变，具有迁移性

细胞黏着和连接相关的成分（如 ECM、CAM）发生变异或缺失，相关信号通路受阻，细胞失去与细胞间和细胞外基质间的联结，易于从肿瘤上脱落。许多癌细胞具有变形运动能力，并且能产生酶类，使血管基底层和结缔组织穿孔，使它向其他组织迁移。

（四）接触抑制现象丧失

正常细胞在体外培养时表现为贴壁生长和汇合成单层后停止生长的特点，即接触抑制现象，而肿瘤细胞即使堆积成群，仍然可以生长。而且，正常真核细胞（除成熟血细胞外），大多须黏附于特定的细胞外基质上才能抑制凋亡而存活，称为定着依赖性。肿瘤细胞失去定着依赖性，可以在琼脂、甲基纤维素等支撑物上生长。

（五）对生长因子需要量降低

体外培养的癌细胞对生长因子的需要量显著低于正常细胞，是因为自分泌或其细胞增殖的信号途径不依赖于生长因素。某些固体瘤细胞还能释放血管生成因子，促进血管向肿瘤生长。获取大量繁殖所需的营养物质。

（六）代谢旺盛

肿瘤组织的 DNA 和 RNA 聚合酶活性均高于正常组织。蛋白质合成及分解代谢都增强，但合成代谢超过分解代谢，甚至可夺取正常组织的蛋白质分解产物，结果可使机体处于严重消耗的恶病质状态。

二、癌基因与抑癌基因

肿瘤的发生是一个复杂的生物学过程，主要是由于细胞内癌基因、抑癌基因及其他相关调节基因突变，从而使细胞基因组失去稳定性，最终导致肿瘤的发生。

（一）癌基因

癌基因是控制细胞生长和分裂的正常基因的一种突变形式，能引起正常细胞癌变。它们自 20 世纪 60 年代在病毒中被发现以来，已被研究得非常透彻。它们的演化史表明，正常脊椎动物细胞含有这些基因，当它们异常表达时能导致细胞恶性生长，使人或动物的正常细胞发生癌变。

癌基因可分为两大类：一类称病毒癌基因，是逆转录病毒中能够使细胞发生恶性转化的基因；另一类称细胞转化基因，存在于细胞中，能使正常细胞转化为肿瘤细胞。正常细胞中癌基因实际上是一些参与细胞生长、分裂和分化的基因。原癌基因广泛存在于生物界（从酵母到人）。我们身体中的每个细胞内有许多基因，一般为 300～400 个，控制正常的细胞功能，这些基因在正常细胞中以非激活的形式存在，故又称为原癌基因。当原癌基因受到多种因素（如病毒、射线、化学致癌物等）的作用使其结构发生改变时，激活成为癌基因，从而使正常细胞转化为肿瘤细胞。现已知道，大约有 60 种癌基因与癌的发生有关。目前，在人类身上已发现了 20 多个癌基因，并定位到了染色体的一定区段上。癌基因的发现是癌症研究中的一项重大突破。癌基因的研究从理论上对癌变机理提供了重要线索，在应用上有助于对肿瘤有更深刻的认识，从而找到更有效的防治措施，另一方面也为细胞生长、分化、衰老等生物学问题提供了理论依据。

（二）抑癌基因

癌基因的发现，激发科学家以更大热情研究与癌发生相关的其他基因。不久，人们发现了存在于细胞内的另一类基因，抑癌基因（又称肿瘤抑制基因）。现在认为，抑癌基因在癌的发生上与癌基因同等重要，甚至更为重要。目前了解最多和最重要的两种抑癌基因是 Rb 基因和 p53 基因。其他还有 NF-1 基因、WT-1 基因、结肠腺瘤性息肉（APC）基因和结肠癌缺失（DCC）基因等。

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因，它与人类50%的肿瘤有关。人类 p53 基因定位于 17P13.1，约 20kb 长，由 11 个外显子和 10 个内含子组成。p53 基因转录成 2.5kb 的 mRNA，编码 393 个氨基酸蛋白，分子量为 53kD。p53 蛋白细胞定位及反式激活功能提示，p53 蛋白可能直接或通过与其他蛋白作用参与转录控制。目前认为，p53 蛋白可通过调控 Cipt 基因表达而调控细胞生长，Cipt 蛋白能够有效抑制某些促使细胞通过细胞周期进入有丝分裂的酶活性，从而抑制细胞生长。然而，p53 蛋白与其他蛋白的相互作用或 p53 基因突变，都可以导致正常生物功能的丧失。目前认为 p53 失活机理是，野生型 p53 以四聚体形式与特异位点结合，反式激活下游生长抑制基因的表达，一系列的方式能使 p53 失活，在一些肿瘤中，单一或两个 p53 位点的丧失降低四聚体浓度，无义突变造成 p53 翻译中断，C-端酸性结构域的丢失影响四聚体形成；最常见的是错义突变，野生型与突变体形成更稳定的四聚体，丧失正常功能。

三、癌细胞与细胞凋亡

正常细胞的生长和分裂是一个高度复杂和精细的过程。为了确保细胞分裂的正常进行，每个细胞内均有一套严格的精确调控细胞增殖过程的监测系统，以维持基因组的稳定性。而细胞凋亡是细胞监测系统重要的组成部分。当细胞基因组受到损伤时，细胞首先启动修复机制，一旦损伤完全修复，细胞则重新进入正常生长状态；倘若修复失败，细胞凋亡机制将被启动，损伤的细胞进入凋亡而被清除，从而避免基因组损伤带到子代细胞，消除了肿瘤发生的潜在

可能。然而，如果调节机制出现异常，会导致本应凋亡的细胞“非法”存活。在细胞癌变过程中，许多凋亡活化基因功能受阻，而凋亡抑制基因的功能得到增强。已经发现，不少肿瘤的发生机制就是由于凋亡受阻引起的，如淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、慢性白血病等。

由于细胞凋亡异常在许多人类癌症的发生、发展中起着重要的作用，科学家们希望通过探讨细胞凋亡机制，了解细胞凋亡与癌细胞死亡的关系，在癌症治疗学中取得新的突破。因此，以选择性地诱导癌细胞凋亡为目标的理论和技术已经成为治疗恶性肿瘤的主要策略之一。实际上，目前临床上采用的放射治疗，大多数化疗药物和生物治疗剂主要都是通过诱导细胞凋亡来清除肿瘤细胞的。科学家们对未来肿瘤治疗的展望是通过凋亡疗法来增加杀死肿瘤的敏感性和特异性。最诱人的策略之一是以诱导细胞凋亡为目标的基因治疗，也就是通过分子生物学的途径在肿瘤细胞内导入诱导凋亡的活化基因或灭活凋亡的抑制基因。这种基因治疗能以特异性的恢复并增强肿瘤细胞内的凋亡功能达到杀死肿瘤的效应。另外，通过小分子化合物、抗体、激素、细胞因子和高温来特异性激活癌细胞凋亡途径，改变癌细胞凋亡的阈值也已经成为增加肿瘤敏感性、提高疗效研究的主要内容。

四、癌症与饮食

癌症病因较复杂，与多种因素有关，这里只谈与饮食的关系。

经调查研究发现，不良的饮食习惯能大大增加患癌症的概率，归纳起来大致有以下几点：

① 缺少维生素 A、维生素 C 和维生素 E；

② 缺少某些微量元素，如钼、锌、镁、硒等；

③ 进食腌制和霉变食物；

④ 饮酒；

⑤ 好吃熏烤食品；

⑥ 病毒感染；

⑦ 高脂肪膳食。

因此，在日常的饮食中应该注意：食用营养丰富的、新鲜的，以植物性食物为主的多样化膳食，多吃各种蔬菜、水果和豆类食品。选用富含淀粉和蛋白质的植物性主食，应占总能量的45 %～60 %，精制糖提供的总能量应限制在10 %以内，还应尽量食用粗加工的食物。总脂肪和油类提供的能量应占总能量的15 %～30 %，限制脂肪含量较多，特别是动物性脂肪较多的食物，最好选择鱼、禽类或非家养动物的肉类为好，植物油也应适量，且应选择含单不饱和脂肪并且氢化程度较低的植物油。限制食盐和酒精的摄入量。

此外，还应保持适宜的体重，坚持体力活动。

第六节　细胞信号转导

细胞是生命活动的最基本单位，是生物体物质、能量、信息综合活动的载体和实现者。构成多细胞生物体的大量细胞受遗传信息及环境变化信息的调节控制。细胞信号转导的主要含义是指细胞间通讯的激素，以及外界环境因子作用于细胞表面（或胞内）的受体后，形成胞内第二信使，然后这些信息在细胞中做出相应的生理反应。这些信息对于细胞的活动起着调控的作用，因此细胞信号传导对于细胞的基因表达及增殖、分化、生长、衰老、死亡起着重要的调节作用。

一、细胞间的通讯方式

（一）周边通讯

相邻细胞间一种短距离的通讯方式，细胞把信息传给相邻细胞或传给自己，例如在发育过程中，某个细胞确定了分化方向，通过周边通把信息告送邻近的细胞。

（二）突触通讯

相邻细胞间的一种长距离通讯方式，如神经细胞的生物电信号到达两个神经细胞的连接处，通过特殊的神经递质传递。

（三）内分泌通讯

体液中进行的长距离通讯，主要是内分泌细胞参与。

二、细胞通讯的要素

（一）细胞信号

细胞信号是指由细胞本身产生的特殊化学分子，其唯一的功能就是与靶细胞的受体结合，从而达到传递信息之目的。激素、神经递质、抗体、淋巴因子、cAMP、Ca^{2+}、NO 等都起到信号分子的作用。其中多肽或蛋白质类的细胞信号常被称为细胞因子。细胞信号在体液浓度极低，半寿期很短，有很强的生物活性。

细胞信号分子的化学特性分为亲脂类和亲水类。亲脂类化学信号包括甾类激素、甲状腺素等，它们中的小分子可以穿过细胞膜进入细胞内，与细胞质或细胞核内的受体结合；大分子则不能穿过细胞膜，只能与膜受体结合。亲水类化学信号包括神经递质、生长因子等，它们不能穿过细胞膜，只能与膜受体结合，经过信号传递机制，在细胞内产生第二信使。

（二）受体

能与细胞信号分子结合的特殊化学物质称为受体。受体识别并与细胞信号分子结合后，就会触发一系列细胞反应。根据受体在细胞中的位置分为膜受体和胞内受体。膜受体位于细胞膜上，与膜内的细胞骨架相联系或在膜内产生第二信使。胞内受体可以与信号分子、DNA 或转录活化物质结合从而调控基因的表达。

1. 受体分子的特性

受体分子绝大多数是蛋白质，受体与其相应的配基（如激素）有高度的亲和力，并能同它发生特异性结合，也可以被配基饱和。体内的激素、神经递质与相应的受体结合后，可引起一系列生化反应，最终导致生理效应。因此受体的特性可归纳为：特异性、亲和性、饱和性和有效性。除此之外，还有可逆性、阻断性等。如激素或递质与受体结合形成的复合物可以随时解离，丧失活性，尔后受体又可以恢复，这就是可逆性。正是由于这种可逆性才得以维持正常的生理功能。某些外源性药物、代谢产物、抗体等可以同受体结合，占据内源性活性物质与受体结合的部位又可阻断其生物效应，这就是阻断性。如阿托品可以同 M 型乙酰胆碱受体结合，占据了

乙酰胆碱与M型受体结合的位点，从而阻断了乙酰胆碱的效应，这就是阿托品药理作用的理论基础。

2. 受体分子的类型

根据受体的亚细胞定位，受体可分为以下几类。

（1）膜受体　这类受体位于细胞膜上，如胰高血糖素、生长激素、催产素、肾上腺素及乙酰胆碱的受体都是膜受体；

（2）胞浆受体　这类受体存在于细胞浆内，如雌二醇、孕酮、睾酮、肾上腺皮质激素等甾体激素的受体；

（3）核受体　这类受体存在于细胞核内，已发现的有甲状腺激素的受体。

三、生物大分子细胞信号传导中的作用

蛋白质、多糖、核酸的生物大分子外形靠非共价键（氢键、离子健、范德华力和疏水相互作用等）维持相对稳定，而且在对分子内或分子间识别起重要作用。在胞内信息交流时，生物大分子负责识别细胞成分的组装，决定细胞的基本结构和基本的代谢形式，指导着细胞代谢及其调节（如酶的催化反应及变构调节）。在细胞间交流时，大分子识别决定同种细胞的粘连（adhesion）、聚集（aggregation）及性细胞的融合等。而核酸的结构信号是在亲代细胞向子代细胞间传递遗传信息，并决定子代生长发育的最基本模式。

（一）蛋白质

蛋白质分子中除了一部分是参与细胞形态构成的结构蛋白质外，还有相当一部分可以称为功能蛋白，如酶、抗体、膜受体等。它们通常通过形状和构象的改变，引起一系列的信号级联反应，产生特定的生理反应。受体与配体结合后即与膜上的偶联蛋白结合，使其释放活性因子，再与效应器发生反应。

（二）多糖及糖蛋白、糖脂

已由证据表明细胞表面糖被结构可能在细胞识别中起重要作用。这种糖被由糖蛋白与糖脂组成，即由寡糖链与膜蛋白和膜脂相连而成，有时还包括吸附在表面的糖蛋白。这些寡糖链很短，但往往具有分支，其末端多为唾液酸残基，从而形成表面净负电荷。其

中，动物细胞直接相互作用、相互识别的一个典型例子是所谓“接触抑制”。正常细胞组织培养时，如生长在固体表面的细胞可以自由分裂、增长，当长成单细胞层相互接触后，细胞分裂即受到抑制。这种抑制显然不是由于某种信号物质远距离扩散造成的，而是接触后传递了某种信息。

（三）核酸

DNA 中的线性核苷酸序列携带着遗传信息。DNA 的复制就是遗传信息复制，细胞通过有丝分裂及减数分裂将遗传信息传递给子代细胞。遗传信息遵循中心法则，通过转录和转译转换成蛋白质。遗传信息流控制调节着生物体生长发育、新陈代谢的基本的信息流。

第三章　基因与遗传

世界上有没有生得一模一样的人？为什么每个人都是独一无二的？基因究竟是什么？基因可以决定一切吗？基因信息是隐私吗？或许这些问题正困扰着你，那让我们一起来探索遗传与基因的奥秘吧！

物生其类、传种接代，一个物种只产生同一物种的后代，这些后代又都继承着上一代的各种基本特征，这种现象就是遗传。但是各种生物所生的后代又不完全像亲代，子代各个体间也不完全一样，这种亲子代间的差异称为变异。遗传使物种保持相对稳定；变异则使物种的进化成为可能。如果没有遗传现象，世界上的各个物种就不可能一代一代地延续下去；同样，若没有变异现象的存在，地球上的生命只能永远停留在最原始的类型，也不可能构成形形色色的生物界，更不可能有人类进化的历史。

第一节　遗传学基本定律

生物能够生生不息，一代又一代地繁衍下去，而且能够把自己的主要特征稳定地传递给后代，靠的是一种什么机制呢？数千年来人类一直在苦苦寻找遗传的奥秘，是伟大的生物学家孟德尔（Mendel，1822—1884）揭示了遗传的基本规律，从而也揭开了现代遗传学的基本篇章。遗传学的三大定律是分离定律、自由组合定律和连锁互换定律。前两大规律是孟德尔进行豌豆杂交试验发现的，后一规律是摩尔根进行果蝇杂交试验发现的。

一、分离定律

（一）性状

性状就是指生物体的一个相对稳定并有相对界限的外表特征或可以考察的生理功能，例如植株的高矮、皮肤的颜色等。如果一个

性状有几种表现形式，那么它们互称相对性状，如豌豆的红花与白花就是一对相对性状，人的四种血型也是互为相对性状。孟德尔的实验就是用具有相对性状的两个品种进行杂交。孟德尔将在杂种一代表现出来的性状称为显性性状，没有表现出来的性状称为隐性性状。他认为这些性状是稳定可遗传的，是由体内的“遗传因子”决定的（现代遗传学认为孟德尔所说的“因子”就是位于染色体上的基因）。孟德尔假定，决定性状的遗传因子成对出现（等位因子或等位基因），其中一个来自父方，一个来自母方，彼此相对独立。并且有两类遗传因子，现在分别叫做显性基因和隐性基因，常常分别用大、小写字母表示它们。

（二）分离定律

分离定律是指决定一个性状的一对遗传因子（基因）在生殖细胞形成时并不互相影响，而是完全按原样分离到不同的配子中去，子二代性状出现 3∶1 的关系。

约翰逊提出了“基因型”和“表现型”这样一对概念。表现型是指生物体表现出可见特征的相对性状，如红花和白花；基因型是指符号所表明的包含实际基因的类型，如 RR、Rr 或 rr。一种显性表现型有两种基因型，如 RR 和 Rr，一种隐性表现型只有一种基因型 rr。RR、rr 基因型的两个基因相同，故称纯合态；Rr 基因型的两个基因不同，一个显性，一个隐性，称为杂合态。

从分离定律可知，基因是纯合的生物可以繁衍和自身一样的子代，即真实遗传，而杂合体不能真实遗传，后代必然会出现分离。如人的先天性肌强直症，表现为普遍性肌强直和肌肥大。本病致病基因为显性基因 M，正常基因为隐性基因 m。如基因型为 MM 的患者与基因型为 mm 的正常人结婚，其所生子代的基因型都为杂合子 Mm，也都是先天性肌强直病症的患者，如果他们与正常人结婚，生出的子代有两种可能，一种是正常人，其基因型为 mm；另一种则为患者，其基因型为 Mm。又如农作物中有许多优良品种，如果是纯合的，就可用收获的种子继续种植，如果是杂合的，就不能用所收获的种子继续种植，必须不断制造杂交种。

二、自由组合定律

在第一定律中，孟德尔考虑的只是一对相对性状的情形；但如果是两对或更多对性状，情形会如何呢？孟德尔用两对相对性状进行杂交实验，发现了遗传的第二个规律——自由组合定律。自由组合规律是指控制性状的等位基因分布在不同的同源染色体上，在形成配子时，每对同源染色体上的等位基因发生分离，而非同源染色体的基因可以自由组合，使后代表现不同的性状，即不同对的基因在形成配子时自由组合。对于 3 对以上的性状的杂交结果，牛顿的二项展开式可以提供相应的信息。$(3+1)^n$ 的展开式表示在有 n 对性状杂交（纯合显性与纯合隐性做亲代）的子二代结果中，有 n 种表现型以及 3^n 种基因型，表现型的比例为 $3^n:\cdots:C_n^k3^k:\cdots:1$。

某人是多指症患者，而又是先天性聋哑人，他的基因型为 PPdd。P 为显性多指基因，d 为隐性聋哑基因。这个男患者与一个正常妇女结婚。她的基因型为 ppDD。p 为正常指基因，D 为正常发音基因。他们所生子代为能说话的多指患者。他的基因型为 PpDd。如果这个子代与一个基因型为 PpDd 的多指正常人结婚，他们的子代可有四种表现型：正常、多指、多指聋哑、正常指聋哑。

三、孟德尔定律的延伸和变化

生物学理论只是广泛的概括，存在许多重要的例外。Mendel 遗传学定律准确地反映了一些有性生殖过程中遗传性状的传递规律，但并不代表所有遗传因子表现的性状及遗传规律。遗传规律具有多样性，但都是孟德尔遗传规律的延伸和变化形式。

分离定律随具体的生物和具体的性状而不相同，分离比例不只表现为 3∶1，也会存在 2∶1、1∶2∶1 和 1∶1 的情形。2∶1 的情况是因为显性基因 R 同时又是一个隐性致死基因（用 R* 表示），每当它纯合为 R* R* 的形式时就导致胎死腹中，R* r 却不会致死（因为 * 是隐性基因）；如此一来，原应为 R* R* ∶R* r∶rr=1∶2∶1 情形就变成 R* r∶rr=2∶1 的情形了。1∶2∶1 的情况是不完全显性情形，即像 Rr 这样的杂合子的表现型既不像显性，也不像隐性，而是处于显隐性之间的状态；于是表现型的比例就与基因

型的比例一致了，只是子二代出现了亲代所没有的不完全显性即中间状态。对于一些低等的单倍体生物，以及二倍体生物中一些与性别决定有关，但又没有对应的等位基因的基因，则分离的表现形式是 1∶1，因为在这些情况里不存在显性和隐性的问题。

另一种例外是复等位基因。复等位基因是指同一种群中，染色体某一位置上的一个基因具有两个或两个以上的等位基因。我们知道，人类 ABO 血型系统有四种血型，分别为 A（基因型为 I^AI^A 和 I^Ai）、B 型（基因型为 I^BI^B 和 I^Bi）、AB 型（基因型为 I^AI^B）和 O 型（基因型为 ii），这样，ABO 血型系统就有 3 个等位基因 I^A、I^B 和 i，其中 I^A 和 I^B 都是显性基因，当它们组合为 AB 型血型时称为并显性现象。

非等位基因之间相互作用的结果使自由组合定律也存在着例外。这些例外有所谓“互作基因”现象，两对基因作用于同一性状；有“基因抑制”现象，使子二代出现 9∶3∶4 的比例；有“上位效应”，使子二代比例为 12∶3∶1；还有“互补效应”，使子二代比例为 9∶7。

另外，还存在多对等位基因只决定一个遗传性状和单个等位基因影响和决定着多种遗传性状的情况。多基因遗传使遗传性状表现出连续性或渐进性的变化，如人类皮肤颜色，植株高度等，表现出由深到浅或由高到低的连续性的变化，这种连续性变化具有正态分布特点，即中间型的个体数量最多，极端的个体数量最少。

四、连锁与互换定律

豌豆的染色体只有 7 对，而它的性状却远大于 7，显然，在一条染色体上必然存在许多基因。如果决定两种性状的基因位于同一染色体上时，那么在生殖细胞的减数分裂时，位于同一条染色体上的决定两种性状的基因，将连在一起随着这条染色体进入一个生殖细胞中。因此，它们不能自由组合，而是连锁在一起传递，这就叫做连锁。在同一条染色体上的所有基因一起构成连锁群，并作为一个单位进行传递的规律，即称为连锁定律。在生殖细胞发生的过程中，两个相对连锁基因之间，可以发生交换的现象，则为交换定

律。基因的连锁和互换规律，被后人称为遗传学第三定律。

染色体上各基因之间的交换率，即发生交换的百分比，是不同的。两个基因靠得越近，染色体交叉的机会就越少，因而基因的交换率越小，反之，交换率就越大。基因的交换率反映了两基因之间的相对距离。根据基因在染色体上有直线排列的规律，把每条染色体上的基因排列顺序制成图称为遗传学图或基因连锁图。

五、伴性遗传

我们已经知道人的性别决定是由一对性染色体 X 和 Y 所决定的。X 染色体远大于 Y 染色体，女人的一对性染色体为 XX，而男人的则为 XY。控制某些性状或疾病的基因位于性染色体上，这些基因可随性染色体向后代传递，因此这些性状或疾病的遗传与性别有关，这种遗传方式称性连锁遗传，亦称伴性遗传。对人类而言，因 Y 染色体短小，缺乏 X 染色体上基因的等位基因，故常把 XY 叫半合子。性连锁遗传分为 X 连锁遗传及 Y 连锁遗传。控制某种性状或某种疾病的基因位于 Y 染色体上，随 Y 染色体传递并表现出相应的性状，称 Y 连锁遗传。其规律是父传子，子传孙，女性不会出现相应的遗传性状和遗传病，也不传递有关基因，故 Y 遗传又叫全男性遗传。X 连锁遗传分为 X 连锁显性遗传及 X 连锁隐性遗传两种。前者指控制某性状的基因位于 X 染色体上且为显性；后者指位于 X 染色体上控制某性状的基因是隐性基因。X 连锁隐性遗传的特点是：有病的人大都为男性；男性患者的子女都正常，代与代之间有明显的不连续性；男性患者的女儿表型正常，但是可能是致病基因携带者，生出来的外孙可能是患者。

色盲基因是隐性的，它位于 X 性染色体上，具有色盲基因的染色体为 X^c，不具有色盲基因的染色体为 X^C。女人只有在 X^c X^c 纯合的条件下，才能是色盲；在 X^C X^c 杂合的条件下，则表现正常。但是男人仅有一个 X^C 或 X^c，而 Y 上没有色盲基因。所以男人在 X^CY 的条件下为正常，在 X^c Y 的条件下，则为色盲患者。因此，当两个色盲男人分别与正常女人婚配时，色盲男人的基因型都是一样的 X^c Y。而他们的妻子的基因型却可能不一样，一个女

人的基因型可为纯合子 X^CX^C，而另一个女人的基因型可为杂合子 X^CX^c。所以两对夫妇生出的子代表型是不同的。同样两个色盲女人，她们的基因型为纯合子 X^cX^c，其中一个色盲女人与正常男人（X^CY）婚配，生出的子代，男孩都是色盲，女孩都是正常的。而另外一个色盲女人与色盲男人（X^cY）婚配，生出的子代，则不论男孩与女孩，都是色盲。

第二节　遗传的物质基础

几乎所有生物遗传的物质基础都是脱氧核糖核酸（DNA），只有一小部分病毒是以核糖核酸（RNA）作为遗传物质的。

一、遗传的染色体基础

孟德尔分析植物杂交试验的结果都用假设的遗传因子来表示，但没谈到遗传因子的物质基础或在细胞中的位置，那么，细胞中什么结构可以和其相对应？1903 年，美国细胞遗传学家萨顿（Walter S. Sutton）在研究蚱蜢的精子发生时发现，染色体在减数分裂时的行为与孟德尔遗传因子的分离、组合之间存在平行关系：在体细胞中，染色体是成对存在的，而孟德尔假设的遗传因子也是成对存在的；它们都有分离现象，配子中染色体成单倍型，而遗传因子也是单个的；在两种生殖细胞结合后，染色体或者遗传因子又表现为二倍性；两对同源染色体和控制两对性状的遗传因子一样，形成配子时都是自由组合和自由分配的。

根据以上分析，萨顿等人提出了遗传因子是位于染色体上的基因的染色体学说。基因的染色体学说将基因看作是染色体上线性排列的单位。

而通过实验方法证实染色体遗传理论并创立了细胞遗传学的代表性人物是摩尔根。摩尔根和他的学生以果蝇为材料进行了大量的遗传学试验，并在 1915 年出版的《孟德尔式遗传的机制》一书中，全面系统地阐述了染色体-基因理论，认为基因是控制遗传性状的单位，并以直线排列在染色体上；生物的某种性状受一个或多个基因所控制，染色体上基因的改变是生物性状变异的直接原因。遗传

的染色体学说可以十分圆满地解释孟德尔的分离定律和自由组合定律。

真核生物细胞核内由 DNA 分子、RNA 分子与蛋白质结合的易被碱性染料着色的复合物称为染色质。在细胞分裂时期，构成染色质的长链 DNA 分子经过紧密缠绕、并与蛋白质结合，形成染色体。每一种生物染色体的数目都是恒定的。多数高等动植物体细胞内的染色体是成对存在的，如正常人体细胞中共有 46 条染色体，构成 23 对。每一对染色体由两条形态功能相同，分别来源于父方和母方的染色体构成。这对染色体称为同源染色体。

在细胞有丝分裂中期，染色体是由两条单体部分连接组成的。染色体单体结构主要由一条 DNA 分子与组蛋白结合形成的一条直径为 11nm 的脱氧核蛋白纤维经过复杂的螺旋、折叠、凝缩而成。每条脱氧核蛋白纤维由许多相似的基本结构单位——核小体组成。核小体由 8 个组蛋白分子组成的圆珠和一条具有 200 个核苷酸对的 DNA 分子构成。在 8 个组蛋白分子组成的圆珠外面围绕 140 个核苷酸对的 DNA 分子，该结构称为核心。其余的 60 个核苷酸对则游离在核心处与另一个核小体相连。这段 DNA 分子称为连接者。这种由许多核小体连成的线状结构模式，称为绳珠模型。

二、遗传的分子基础

虽然以摩尔根为代表的遗传学家们创立了染色体遗传理论，认为基因位于细胞核里的染色体上，双亲传给子女的不是眉毛、眼睛、鼻子、嘴巴等具体性状，而是一套染色体。但对于遗传的物质基础是什么，即基因的化学本质的问题，却一直没有确切的答案。直到 20 世纪 50 年代后期，人们仍普遍认为蛋白质是生物遗传的物质基础，即基因的主要成分是蛋白质。

1928 年英国细菌学家格里菲斯（F. Griffith）利用肺炎双球菌的光滑型（有荚膜，毒性强，可引起动物发生肺炎，简称 S 型）和粗糙型（无荚膜，不引起疾病，简称 R 型）分别注射小鼠，S 型使小鼠死亡，R 型不使小鼠致死；若将 S 型加热杀死再注入小鼠体内，小鼠不死；若将加热杀死后的 S 型与 R 型混合，并给小鼠注

入，则小鼠死亡并在小鼠体内发现S型。他们的结论是：可能是死细菌中的某种物质将无致病能力的细菌转化为病原细菌。

这就是在细菌中首次发现的转化现象。转化现象是一个菌株吸收了来自另一个菌株的一些遗传物质以后，它的遗传性状便按后一菌株而发生改变的现象。前一个菌株到底吸收了后一个菌株的什么物质，即“转化因子”是什么？直到1943年，美国化学家艾弗利（O. T . Avery ）和他的同事用实验证实基因的化学本质是DNA。他把从S型细菌提取的DNA与R型细菌共同培养发现有R型细菌转化为S型，且转化率与DNA纯度呈正相关，若将DNA预先用DNA酶降解，转化就不发生，而RNA和蛋白质等其他提取物都没有使R型细菌转变为S型的能力，从而确定生物的遗传物质是DNA，而不是蛋白质。

另一个证明DNA是遗传物质的实验是1952年Hershey和Chase利用噬菌体为实验材料做的。病毒是一种比细菌更加简单的个体，它仅含有少量简单的DNA（或RNA），被一层蛋白质的外壳所包裹。病毒不能自我完成繁殖过程，它必须通过感染其他细胞才能完成繁殖。专门感染细菌的病毒称为噬菌体。

Hershey和Chase将放射性同位素^{35}S加入细菌培养基中进行噬菌体的培养，这样噬菌体蛋白质外壳便被^{35}S标记了。接着他们又用^{32}P标记了噬菌体的DNA。然后分别用这些噬菌体去感染细菌，将被感染的细菌通过搅拌破碎器作用，附在细菌细胞壁外的噬菌体与细菌脱离，然后用离心机分离，离心管的上清液含有较轻的噬菌体颗粒，离心管的沉淀中则是被感染过的细菌。Hershey和Chase发现，经^{35}S标记的一组实验，仅在上清液中检测到放射性同位素；^{32}P标记的一组实验，仅在沉淀中检测到放射性同位素。实验结果说明，噬菌体感染细菌时，仅是DNA进入到细菌的细胞中，而蛋白质外壳没有进入到细菌的细胞。而且在从细菌中释放出的新病毒中也检测到了^{32}P标记的DNA，而没有检测到^{35}S标记的蛋白质。Hershey和Chase的实验又一次证明，在病毒繁殖时DNA得到复制并且控制了新蛋白质外壳的合成。

1956 年德国学者 Schramm 和美国学者 FraenkelConnat 将烟草花叶病毒的蛋白质和 RNA 分别提取出来，分别涂抹在健康的烟草叶子上，结果只有涂抹 RNA 的叶片的病，而涂抹蛋白质组分的叶片不得病。这就证明在不具有 DNA 的病毒中，RNA 是遗传物质。

上述试验证明，生物遗传的物质基础是脱氧核糖核酸或核糖核酸。

三、基因的结构与功能

1909 年，丹麦遗传学家约翰逊（W. L. Johanasen）首先提议用“gene”一词取代孟德尔提出的“遗传因子”，并提出“基因型”和“表现型”等遗传学概念。我国学者把英文“gene”翻译成“基因”。目前我们所说的“基因”就是孟德尔所说的遗传因子，每个基因决定（或参与）生物的一个特定的性状的遗传。

Avery 等证明基因的化学本质就是 DNA 分子后，Watson 和 Crick 提出 DNA 分子的双螺旋结构模型，使人们对基因的研究深入到其分子结构和功能的研究上。基因是指 DNA 分子上的一个大约有 500～6 000 个碱基的区段。但基因的概念与 DNA 分子不能等同：一方面，在生物界中，并非所有的基因都是由 DNA 构成的，某些病毒、噬菌体等生物的遗传物质是 RNA 而不是 DNA；另一方面，DNA 分子并不一定就是基因。有些 DNA 序列，如卫星 DNA、rRNA 基因间的空档区等，不论是单拷贝或多拷贝的都是非转录的，它们既不编码蛋白质又不编码 RNA，是一些不能作为基因的 DNA 分子。

随着分子生物学的发展，人们对基因的认识也越来越深入，分子生物学给基因下的定义是：一个基因是编码一条多肽链或功能 RNA 所必需的全部核苷酸序列。基因包括以下几种：① 结构基因与调节基因，这两类基因不仅可转录成 mRNA 而且可翻译成多肽链，调节基因的作用是调控其他基因的活性，转录成的 mRNA 翻译成阻遏蛋白质或激活蛋白质；② 核糖体 RNA 基因与转运 RNA 基因，这类基因只转录产生相应的 RNA 而不翻译成多肽链；③ 启

动子和操纵基因，启动子是转录时 RNA 聚合酶与 DNA 结合的部位，操纵基因是调节基因产物与 DNA 结合部位，它们都是不转录的 DNA 片段，确切地说不能称它们基因。

原核生物的基因一般是一段连续的 DNA 序列，主要有编码区和非编码区两部分组成，中间无内含子。基因之间由非编码的间隔序列隔开，形成了串珠状的结构，把许多单个基因连接在一起。但有些基因之间可以重叠，形成重叠基因。

真核生物的基因也由编码区和非编码区两大部分组成，但在内部结构上要比原核生物的复杂。许多真核生物基因编码区中包括内含子和外显子；调节区中有启动子和增强子；编码区上游有 mRNA5′端非编码区，下游有 mRNA3′端非编码区。

基因的基本功能一方面是通过半保留复制，将母细胞的遗传信息传递给子细胞，以保证个体的生长发育，并在繁衍的过程中保持遗传性状的相对稳定。另一方面是经过翻译、转录而控制蛋白质的合成，构成各种细胞、组织，形成各种酶，催化生命活动中的各种生化反应，从而影响了遗传性状的形成，使遗传信息得以表达。一旦 DNA 分子结构发生改变，它所控制的蛋白质中氨基酸顺序也发生了改变，这就是突变，也是异常性状和遗传病的由来。

四、基因的顺反子概念

在 20 世纪 40 年代中期，为了研究基因的分子结构，人们用曲霉菌和果蝇进行了许多杂交实验。在曲霉菌中，发现有的需在培养基中添加腺嘌呤才能生长，即腺嘌呤营养缺陷型。当用两个腺嘌呤缺陷型 ad16 和 ad8 杂交时，杂种仍为缺陷型，这表明 ad16 和 ad8 为等位基因；但在许多杂种中出现了约 0.14% 的野生型，说明 ad16 和 ad8 又不像等位基因，遗传学上把它们称为拟等位基因，即是指表型效应类似，功能密切相关，在染色体上的位置又紧密连锁的基因。它们像是等位基因，而实际不是等位基因，二者之间可以发生重组。

在上述拟等位基因的杂交实验中，两个拟等位基因都在同一条染色体上，另一条同源染色体的相对位置上则排列着野生型基因，

表现为野生型，这种排列方式称为顺式排列；如果上述的两个拟等位基因分别位于两条同源染色体上，使两条染色体都是有缺陷的，表现为突变型，这种排列方式称为反式排列。顺式排列和反式排列的组成都一样，只是排列方式不同，从而引起表型效应的不同，这种现象称为顺反效应。

Benzer 用 T_4 噬菌体的一群紧密连锁的突变群（rⅡ突变）进行大量的互补实验，研究 rⅡ突变型间的互补作用，从而确定突变型的功能关系。互补实验结果表明，rⅡ突变型可分为 A 和 B 两组，分别属于两个不同的遗传作用单位，或者说它们是非等位的基因，在功能上可以互补，而 A 组内或 B 组内的两个突变型却同属于一个位点的拟等位基因，在功能上它们之间不能互补。A、B 两组中任一组的突变不能影响另一组的功能，这说明 rⅡ突变群中的 A、B 组是两个独立的遗传功能单位。Benzer 把通过互补实验而发现的这种遗传功能单位称为顺反子，实际上一个顺反子就是一个基因。同时他认为一个顺反子是遗传上不能再分的一个功能单位，但它并不是一个突变单位或重组单位；顺反子要比突变单位或重组单位大得多，它的内部可以发生突变或重组，即它可以包含着许多突变子和重组子。这在基因概念上是一个突破。

五、基因的现代概念

遗传学的发展其实就是基因概念的发展。近年来科学工作者在分子水平上对基因的结构与功能的研究，发现了“重复基因”、“断裂基因”、“跳跃基因”、“假基因”、“重叠基因”等有关基因的新概念，从而丰富并深化了人们对基因本质的认识。

（一）重复基因

在真核生物基因组中，许多来源相同、结构相似、功能相关的基因在染色体上成串存在，这样的一组基因称为基因家族。它们中的有些基因集中串联排列在一条染色体上，形成一个基因簇，称为重复基因。如 rRNA 基因、tRNA 基因、组蛋白基因等。

（二）断裂基因

绝大多数真核生物的基因都是不连续基因，即在基因编码蛋白

质的序列中间插入有与蛋白质编码无关的 DNA 间隔区，使一个基因分隔成不连续的若干区段。这种编码序列不连续的间断基因称为断裂基因。在断裂基因中，编码的序列称为外显子；而把不编码的序列称为内含子。

（三）跳跃基因

跳跃基因又称为移动基因或转座子。它可以从染色体基因组上的一个位置转移到同一条染色体或另一条染色体的另一个位置。这种基因是生物基因组中的一些特殊 DNA 序列，其长度变异很大，两端带有一段重复序列。

（四）假基因

在一些基因家族中，有一些核苷酸序列与编码某一蛋白质的基因相似，但不具有功能，即不能转录形成成熟的 mRNA 或不能翻译出功能蛋白质，这种序列称为假基因。

（五）重叠基因

重叠基因是指共同使用同一 DNA 序列，但编码两种不同蛋白质的两个基因。它是由英国分子生物学家 Sanger 等（1977）人在测定 ϕX174 噬菌体 DNA 的核苷酸序列时发现的。ϕX174 噬菌体 DNA 的全序列共有 5 375 个核苷酸，编码 9 种蛋白质，这 9 个基因有些是重叠的。其重叠情况主要有两种：一种是一个基因的核苷酸序列完全在另一个基因里面，并且彼此的密码读框不同；另一种是两个基因之间的核苷酸序列有部分重叠，如 A 基因的终止密码子（TGA）与 C 基因的起始密码子（ATG）相互重叠了 2 个核苷酸，D 基因的终止密码子的最后一个碱基是 J 基因起始密码子的第一个碱基。

第三节　遗传信息的传递与表达

生物体的遗传信息主要储存于染色体的 DNA 分子中，而遗传信息的表达则是通过各种各样的蛋白质来实现的。DNA 上的遗传信息不能直接传递给蛋白质，而是通过中介物 RNA 把遗传信息传递给蛋白质来控制蛋白质合成。因此，DNA 是通过转录和翻译两

个生化过程实现和控制蛋白质合成的。

一、从 DNA 到 RNA——转录

以 DNA 分子为模板，按照碱基互补的原则，合成一条单链的 RNA，DNA 分子携带的遗传信息被转移到 RNA 分子中，这一过程被称为转录。转录是基因表达的第一步，也是最关键的步骤。转录发生在细胞核中，其过程与 DNA 的复制基本相同。

RNA 合成的前体是 ATP、GTP、CTP 和 UPT4 种 5′-核苷三磷酸（rNTP）。由于 RNA 聚合酶是按 5′→3′的方向合成 RNA 链，所以 DNA 双链中只有 3′→5′的 DNA 链才能作为 RNA 合成的模板。RNA 的合成是按 5′→3′的方向进行延伸。转录的第一步是转录因子与启动子结合后，RNA 聚合酶识别并结合到启动子上，使 DNA 分子的双链解开，开始转录。启动子是 DNA 链上的一段特定的核苷酸序列，位于被转录基因的开始位置，转录起点即位于其中。RNA 聚合酶沿着模板链由 3′端向 5′端移动，一方面使 DNA 链陆续解开，同时将和模板 DNA 上的碱基互补的核苷酸通过磷酸二酯键连接起来形成 RNA 链。当 RNA 聚合酶沿模板链移动到 DNA 上的终止子（起转录终止信号的 DNA 序列，其功能是在 DNA 模板上的一个特定点停止 RNA 合成）后，RNA 聚合酶即停止工作，新合成的 RNA 脱离模板 DNA 游离于细胞核中。

各种基因转录后的前体 RNA（pre-RNA）都是不成熟的 RNA，不具备生物活性和独立功能，必须经过适当的加工处理，才能成为有生物学功能的成熟 RNA。

转录后新合成的 mRNA 是未成熟的 mRNA，又称为前体 mRNA 或核内非均一 RNA，这些 RNA 需要经过一定的加工过程，包括在转录后的 RNA 的 5′端加一个甲基化 G 的“帽子”和在 3′端加上一个多聚腺苷酸的尾，在 RNA 特定部位进行剪接，除去内含子，拼接外显子，然后进入细胞质。原核生物的 mRNA 往往一生成就是成熟的，不需转录后的加工即可表现模板活性，而且转录和翻译几乎是同时进行。它唯一接受的加工只是自身的轻微裂解，如噬菌体 T_4 先转录出多顺反子型 mRNA 前体然后裂

解成几个单顺反子 mRNA 分子；但不进行裂解，翻译作用仍可进行。

二、遗传密码与蛋白质合成——翻译

蛋白质的合成是遗传信息传递的最后一步，即中心法则中的翻译（translation）。翻译是以 mRNA 为模板，在酶的催化下，利用细胞中的 20 种氨基酸在核糖体上合成蛋白质的过程。

（一）遗传密码

DNA 分子中碱基排列顺序是如何决定蛋白质分子中的氨基酸排列顺序的呢？1954 年理论物理学家 Gamov 首先提出了遗传密码的概念，他通过计算，认为在翻译时 3 个碱基决定一个氨基酸。在 mRNA 分子中每 3 个碱基组成一组构成一个三联体，称为一个“密码子”，一个密码子决定一个氨基酸。mRNA 分子中的 4 种碱基形成 4^3 即 64 种不同的密码子。1961 年 Nirenberg 通过实验证明了三联体密码，并发现 UUU 编码苯丙氨基酸，之后经科学家们的努力，到 1966 年译完全部 64 种密码子，得出了生物界中通用的遗传密码表（表 3-1）。表中的 64 个密码子有 61 个密码子决定氨基酸，且一种密码子只能决定一种特异的氨基酸；UAA、UAG 和 UGA 这三个密码子是起蛋白质合成的终止信号的作用，故称为终止密码子；AUG 和 GUG 是甲硫氨酸及缬氨酸的密码子，同时又兼有蛋白质合成起始信号的作用，又称为起始密码子。

表 3-1　遗传密码字典

第一碱基	第二碱基								第三碱基
	U		C		A		G		
U	UUU	苯丙氨酸	UCU	丝氨酸	UAU	酪氨酸	UGU	半胱氨酸	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	亮氨酸	UCA		UAA	终止	UGA	终止	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	色氨酸	G
C	CUU	亮氨酸	CCU	脯氨酸	CAU	组氨酸	CGU	精氨酸	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	谷氨酰胺	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G

续表

第一碱基	第二碱基								第三碱基
	U		C		A		G		
A	AUU	异亮氨酸	ACU	苏氨酸	AAU	天冬氨酸	AGU	丝氨酸	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	赖氨酸	AGA	精氨酸	A
	AUG	甲硫氨酸	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	缬氨酸	GCU	丙氨酸	GAU	天冬氨酸	GGU	甘氨酸	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	谷氨酸	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

（二）遗传密码的性质

1. 遗传密码的简并性

生物体内组成蛋白质的氨基酸只有 20 种，而决定氨基酸的密码子却有 61 种，所以许多氨基酸有多个密码子，这种两个或两个以上的密码子编码同一种氨基酸的现象称为简并，而编码同一种氨基酸的密码子称为简并密码子或同义密码子。简并密码子越多，生物遗传的稳定性就越大，因为一旦 DNA 分子上的第三个碱基发生突变，突变后所形成的密码子，可以与原来的密码子一样翻译成同样的氨基酸，从而在蛋白质分子结构上便不会出现任何变异，所以简并现象对生物遗传的稳定性有着重要的意义。密码子数与所编码的氨基酸含量之间存在着正相关，即编码某一氨基酸的密码子越多，该氨基酸在蛋白质中出现的频率也越高。只有精氨酸是个例外，因为在真核生物中 CG 双联子出现的频率低，所以尽管有 4 个密码子编码，精氨酸在蛋白质中的出现率仍较低。

2. 无逗号及不重叠性

密码与密码之间没有逗号，翻译从起始密码开始然后按连续的码组沿 mRNA 多核苷酸链由 5′至 3′方向进行，直到终止密码处，翻译自然停止。在多核苷酸链上任何两个相邻的密码不共用任何核苷酸。

3. 遗传密码的普遍性与特殊性

许多研究证明，不管是在体内还是在体外，不管是对病毒、细菌、动物还是植物，遗传密码都是通用的。遗传密码虽然具有普遍性，但近年来发现一些特殊的情况。例如，在某些原生动物和藻类中，UAA 和 UAG 不起终止作用，而是决定谷氨酰胺；在支原体中，UAG 决定色氨酸。有些密码子在核 DNA 和线粒体 DNA 中所决定的氨基酸不同。

4. 密码子和反密码子的碱基配对

在蛋白质合成过程中，决定氨基酸的密码子有 61 个，氨基酸有 20 种，而与氨基酸对应的 tRNA 则有 31 种，这意味着一种氨基酸可能有一种以上的相应的 tRNA，而一个 tRNA 分子可能与 mRNA 上一种以上的密码子进行碱基配对。1966 年 Crick 根据立体化学原理提出了摆动假说，认为在密码子与反密码子的配对中，前两对碱基严格遵守 A 与 U、G 与 C 配对的原则，而第三对碱基允许错配，或者说可以有某种程度的摆动，因而使某些 tRNA 可以识别 1 种以上的密码子。

（三）翻译

mRNA 的翻译需要有 mRNA 、tRNA 、核糖体、多种氨基酸和多种酶等的共同参与。蛋白质生物合成的具体过程包括氨基酸的活化，肽链的起始、延长、终止，新合成肽链的加工等环节。

蛋白质的合成是一个非常迅速的过程。在 30℃时，细菌细胞内合成速度为每秒钟 15 个氨基酸；在真核生物中蛋白质合成速度稍低一些，约每秒钟 2 个氨基酸。另外，在蛋白质合成过程中，由于同一条 mRNA 链上可以发生多次起始，所以 mRNA 链上同时有多个核糖体在进行同一种多肽链的合成，每个核糖体之间大约相隔 80 个碱基。

新生的多肽链大多数是没有功能的，必须加工修饰才能转变为有活性的蛋白质。首先要切除 N 端的 fMet 或 Met，还要形成二硫链，进行磷酸化、糖基化等修饰并切除新生肽链非功能所需片段，然后经过剪接成为有功能的蛋白质，从细胞质中转运到需要该蛋白质的场所。

三、中心法则

1958 年 Crick 首次提出中心法则的内容，随后 Watson 于 1976 年又做了更具体详细的描述。中心法则的内容可概括为以下三点。

① DNA 分子上的碱基排列有一定顺序，这顺序就是遗传信息。生物的全部遗传信息都包含在这种大分子的遗传信息之中。

② DNA 分子双链拆开，以每条单链为模板，按照碱基配对的原则，合成新的互补链，这是 DNA 的自我复制。

③ 以 DNA 分子双链中的一条为模板，按照碱基 A-U、G-C 配对的原则互补地合成 mRNA 链，这是转录。然后以 3 个碱基决定一个氨基酸的方式，根据 mRNA 分子上的碱基排列顺序合成蛋白质，这是翻译。

中心法则说明了遗传信息由 DNA 传向 DNA，或由 DNA 传向 mRNA，然后通过其中某些 RNA 的翻译产生特异的蛋白质（酶和结构蛋白）的过程。

以上是大多数生物遗传信息传递的途径，但反转录病毒如艾滋病病毒、流行性感冒病毒、小儿麻痹症病毒等，是以 RNA 为遗传物质。在感染细胞期间，反转录病毒可以以自身 RNA 为模板，在反转录酶的作用下合成 cDNA（以 RNA 为模板经反转录产生的 DNA 称为 cDNA ），然后以这段病毒 cDNA 为模板，互补合成 RNA，再以 mRNA 为模板合成蛋白质。而且病毒 DNA 可插入到细胞染色体 DNA 中把遗传信息传递下去。反转录病毒的发现进一步完善了生物遗传信息传递的方向，使人们可以利用 mRNA 为模板，通过反转录产生 cDNA，获得编码真核生物蛋白质的基因。

但多肽抗生素及朊病毒的发现向中心法则提出了挑战。多肽抗生素是细菌产生的抗生素中的一类，研究表明，它们的合成是直接由某些多酶体系来完成的。多肽抗生素肽链中的氨基酸序列是由这些酶上所吸附的氨基酸序列决定的。朊病毒是一种传染病原体，它是一种蛋白质病原。它能引起人和动物的神经软化病，如人类的 Kuru 病、牛的疯牛病等。在该病毒的感染过程中，遗传信息可以从蛋白质传向蛋白质。这与中心法则中蛋白质不能输出信息的概念

相矛盾，可见中心法则还有许多问题需要解决。

四、基因表达调控

生物的全部遗传信息都是以基因的形式储存在细胞内的 DNA（或 RNA）分子中。随着生物个体的生长发育，编码于基因中的遗传信息被解码成蛋白质分子，从而决定细胞表型和生物性状的整个过程称为基因表达。对基因表达的调节和控制就称为基因表达调控。基因调控是现代分子生物学研究的中心课题之一。许多生命现象的深层次问题都与基因表达的调控有关，要了解动植物生长发育规律、形态结构特征及生物学功能，就必须搞清楚基因表达调控的时间和空间概念，掌握了基因表达调控的规律，人们才能真正揭示生命的奥妙。

基因表达调控的指挥系统有很多种，不同生物使用不同的信号来指挥基因调控。原核生物和真核生物之间存在着较大差异。原核生物中，营养状况、环境因素对基因表达起着十分重要的作用；而真核生物尤其是高等真核生物中，激素水平、发育阶段等是基因表达调控的主要手段，营养和环境因素的影响则为次要因素。

（一）原核生物的基因表达调控

原核生物的基因表达调控虽然比真核生物简单，然而也存在着复杂的调控系统，操纵子学说在原核生物基因结构及其表达调控中具有普遍性意义。原核生物的基因是由两部分构成的，一部分是编码功能蛋白质的结构基因，另一部分是调控结构基因表达的调控基因。而多个功能相关的结构基因往往串联在一起构成一个转录单位，依赖相同的调控基因对其转录进行调节，使这些相关基因实现协同表达。这样的一个多顺反子转录单位加上它的调控基因就称为操纵子。

从结构上看，每个操纵子可分为结构区（结构基因）和调控区两部分。调控区位于转录起始点附近，包括与 RNA 聚合酶结合的启动基因、与阻遏蛋白结合的操纵基因和某些情况下与激活蛋白结合的位点。编码阻遏蛋白的调节基因位于转录起始点上游。RNA 聚合酶、启动基因、操纵基因等的相互作用，使基因开始转录成

mRNA。

1. 乳糖操纵子

法国巴斯德研究所著名的科学家 Jacob 和 Monod 在实验的基础上于 1961 年建立了乳糖操纵子学说，现在已成为原核生物基因调控的主要学说之一。

大肠杆菌乳糖操纵子包括 4 类基因。

① 结构基因：能通过转录、翻译使细胞产生一定的酶系统和结构蛋白，这是与生物性状的发育和表型直接相关的基因。乳糖操纵子包含 3 个结构基因：lacZ、lacY、lacA。LacZ 合成 β-半乳糖苷酶，lacY 合成透过酶，lacA 合成乙酰基转移酶。

② 操纵基因 O：控制结构基因的转录速度，位于结构基因的附近，本身不能转录成 mRNA。

③ 启动基因 P：位于操纵基因的附近，它的作用是发出信号，mRNA 合成开始，该基因也不能转录成 mRNA。

④ 调节基因 i：可调节操纵基因的活动，调节基因能转录出 mRNA，并合成一种蛋白，称阻遏蛋白。

操纵基因、启动基因和结构基因成簇串联排列共同组成一个基因表达的协同单位——操纵子。

调节乳糖催化酶产生的操纵子就称为乳糖操纵子。大肠杆菌就通过乳糖操纵子的基因表达调控，在有乳糖的环境中合成有关利用乳糖的酶，在无乳糖的环境中停止合成这些酶。其调控机制简述如下。

抑制作用：调节基因转录出 mRNA，合成阻遏蛋白，阻遏蛋白构象能够识别操纵基因。缺少乳糖时，阻遏蛋白结合到操纵基因上，因此 RNA 聚合酶就不能与启动基因结合，结构基因也被抑制，结果结构基因不能转录出 mRNA，不能翻译出酶蛋白。

诱导作用：乳糖存在情况下，乳糖能和调节基因产生的阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白改变构象，不能再和操纵基因结合，失去阻遏作用，结果 RNA 聚合酶便与启动基因结合，并使结构基因活化，转录出 mRNA，翻译出酶蛋白。

负反馈：细胞质中有了β-半乳糖苷酶后，便催化分解乳糖为半乳糖和葡萄糖。乳糖被分解后，又造成了阻遏蛋白与操纵基因结合，使结构基因关闭。

2. 色氨酸操纵子

色氨酸操纵子负责调控色氨酸的生物合成，它的激活与否完全根据培养基中有无色氨酸而定。当培养基中有足够的色氨酸时，该操纵子自动关闭；缺乏色氨酸时，操纵子被打开。色氨酸在这里不是起诱导作用而是阻遏，因而被称作辅阻遏分子，意指能帮助阻遏蛋白发生作用。色氨酸操纵子恰和乳糖操纵子相反。

（二）真核生物基因表达调控

真核生物基因表达调控与原核生物有很大的差异。

1. 原核生物与真核生物基因组 DNA 存在的形式不同

因此原核生物与真核生物在基因表达和调控方面具有完全不同的机制。原核生物的 DNA 一般不与蛋白质结合形成染色质结构，因而可以快速作出基因转录的起始及终止的决定和反应。但大多数真核生物的 DNA 都与蛋白质紧密结合形成核小体，再经多次螺旋产生染色质结构，使真核生物基因不具备快速转录起始的能力。

2. 基因表达调控的层次和复杂程度不同

原核生物没有核膜结构，转录和翻译在细胞内同一部位进行，使转录和翻译密切偶联，翻译可以对转录发生影响。且原核生物基因转录通用一种 RNA 聚合酶，不同基因的转录调控区基本类似。而真核生物有核膜，转录和翻译在两个彼此分开的区域：细胞核和细胞质中进行。转录产物需经加工剪接后才具有功能，具有三种不同的 RNA 聚合酶转录体系。因此，基因表达调控比原核生物有更多的机会，更多的层次，运用了更加复杂甚至可能是全新的机制。

3. 基因转录调控的方式不同

原核生物基因转录调控以负调控为主，即通常由阻遏蛋白与相应的调控序列结合，阻止 RNA 聚合酶的转录，但可通过一些诱导作用解除对基因的阻遏。而真核生物基因转录以正调控为主，RNA 聚合酶需在转录因子的协助下才能起始转录。

4. 基因调控信号及基因表达调控的目的不同

原核生物同一群体的每个细胞都和外界环境直接接触，其对基因表达进行调控的目的主要是为适应环境变化，使其生长繁殖达到最佳状态，故环境因子往往是调控的诱导物。而大多数真核生物的细胞只有一小部分间接地受到外界环境条件的影响，大部分细胞基本上不受影响。真核生物对基因表达进行调控，尽管在某种意义上也是为了适应环境条件，但其最主要的目的是为了调控在个体生长发育的特定阶段中，遗传信息的规律性表达，并使生物的组织和器官在一定的环境条件范围内保持正常的生理功能。

5. 转录单位不同

多数原核生物基因转录单位为多顺反子（polycistron），即包含多个为 RNA 编码或多肽链编码的序列。而真核生物基因多为断裂基因，转录产物必须进行剪接加工。编码为多肽链的基因为单顺反子（monocistron），一个 mRNA 分子只编码一条多肽链。

真核生物基因表达调控可以发生在遗传信息传递过程的各个水平上。包括：①DNA 水平的调控，如基因丢失、基因扩增、基因重排、DNA 甲基化及染色体结构变化等；②转录水平调控，如 mRNA 的产量和稳定性、mRNA 的剪接、mRNA 从细胞核向细胞质的选择性运输、mRNA 编辑等，转录调控是基因表达调控中最重要、最复杂的一个环节，也是当前研究的重点；③翻译水平的调控，如翻译起始调控、蛋白质修饰、蛋白质降解、蛋白质磷酸化等，这是基因表达调控的最后一步，几乎是影响蛋白质合成的任何因素都能调节基因表达。

第四节　遗传病与基因治疗

遗传病是指遗传物质改变而导致的疾病。人类的遗传性疾病种类很多，可划分为 3 大类型，即染色体缺陷病、单基因遗传病和多基因遗传病。染色体缺陷病是由于染色体畸变导致的遗传病。单基因的遗传病只与一对基因有关，主要是由基因突变引起的，如白化病、血友病、色盲等。多基因遗传病是指由几对基因的变化引起的

疾病，这类遗传病与环境有密切的关系，用遗传率表示遗传因素对发病作用的大小，遗传率70%以上，说明遗传因素比较重要，如兔唇、支气管哮喘、神经分裂症等；遗传率在50%～60%左右的，说明遗传与环境因素都相当重要，如高血压、冠心病等；遗传率40%以下的，说明环境因素是主要的，如先天性心脏病、消化性溃疡、成年型糖尿病等。

一、染色体畸变与染色体缺陷病

细胞中的染色体的数目或其结构有异常的改变称为染色体畸变。

（一）染色体数目畸变

绝大多数真核生物的体细胞内含有2套染色体组，称为二倍体（$2n$）。染色体数目畸变分整倍性（euploid）改变和非整倍性（aneuploidy）改变。

1. 整倍性改变

如果体细胞中染色体数目的改变是以二倍体产生的正常配子中的染色体数为单位进行增减时，称为整倍性改变。整倍性改变可产生多倍体或单倍体。多倍体动物常死于早期胚胎中，植物中较常见，如无籽西瓜为3倍体（$3n$），普通小麦为六倍体（$6n$）。

2. 非整倍性改变

细胞中的个别染色体数目增加或减少了一条或几条，这样的个体称为非整倍体。细胞中染色体数较二倍体数多时叫超二倍体，较二倍体数少时称为亚二倍体。

① 单体型：某同源染色体少一条，使细胞染色体数为$2n-1$。单体型主要见于女性X染色体减少一条的特纳氏综合征（Turn's syndrome），这样使性腺发育不全。常染色体单体型一般死于胎儿或流产。

② 多体型：某同源染色体有三条或三条以上。三体型即某一染色体增加了一条，使体细胞染色体数为$2n+1$。如Down综合征（21三体）、Edward三体综合征（18三体）和Patau氏综合征（13三体）。

（二）染色体结构畸变

染色体结构畸变是由于染色体断裂及不同染色体断裂后非原位重接产生的。染色体结构畸变主要分为四种类型。

① 缺失：染色体断裂丢失了一段。

② 重复：同源染色体在联会时交换不相等的片段，形成有重复片段的染色体。

③ 倒位：一条染色体两个不同位点上发生断裂，中间片段作180°倒转后再与两段相接，形成倒位的染色体。倒位一般未造成遗传物质丢失，故个体通常没有表型异常。

④ 易位：一条染色体的断裂片段移接在另一条断裂的染色体上，称为易位。

（三）染色体畸变引起的疾病

染色体畸变改变了染色体上原有的基因排列，或使某些基因增加或丢失，这些变化都会产生遗传疾病。由于染色体畸变会涉及较多的基因，同时也由于基因的多效性，因而常引起许多系统的形态和功能异常。表现在临床上常常是多样的综合征。

1. 21 三体综合征（先天愚型或 Down 综合征）

病人核型为 21 三体型，患病原因是由于比正常人多一条第 21 号染色体所引起的。该病临床特征为眼距过宽，外眼角上倾，眼裂小，常有斜视；耳廓畸形，颌小，口常半开，舌大外伸，流涎；手宽而肥，通贯手，指短，第五指内弯；智力发育不全，智力较好的患者可学会阅读或做简单的手工劳动。患病较重者语言和生活自理有困难。

2. 5p－综合征（猫叫综合征）

病人核型为 46，5p－，是第 5 号染色体短臂（p）缺失引起的。患儿哭声如猫叫；生长发育迟缓，智力发育差；头小，眼距宽，外眼角下斜；耳位低，小颌，腭裂，并指，常伴有先天性心脏病。

3. 先天性睾丸发育不全综合征（Klinefelter 综合征）

病人核型为 47，XXY。比常人多了一条 X 染色体。患者外表

为男性，青春期开始有症状。患者具有去势体征的男性外生殖器，阴茎短小，睾丸很小，有时为隐睾。患者体毛稀少，无须，无喉结，乳房女性化。

4. 慢性粒细胞白血病

22 号染色体中的一条染色体长臂断裂，断裂片段移到第 9 号染色体中的一条长臂上。

二、基因突变与单基因及多基因遗传病

核酸序列的改变称为基因突变。基因突变可以是 DNA 序列中单个核苷酸或碱基发生改变，也可以是一段核酸序列改变。

（一）基因突变类型

碱基序列的改变分为碱基替换和移码突变两大类型。

1. 碱基替换

一个碱基对被另一个碱基对所代替叫做碱基替换。以嘌呤替代嘌呤或嘧啶替代嘧啶的替换称为转换。嘌呤替代嘧啶或嘧啶替代嘌呤的替换形式称为颠换。

每一次碱基替换过程只改变一个密码子，不会涉及其他的密码子。替换的结果有时可以不影响其所翻译的蛋白质的结构和功能，这种基因突变称为同义突变。但是，有的碱基对的替换造成一个密码子的改变的同时，也改变了多肽链上一个氨基酸。这种造成单个氨基酸改变的碱基对替换称为错义突变。如果错义突变使得所编码蛋白质或酶的重要部位如结构域或活性中心的氨基酸被替换，就会改变蛋白质的结构和功能，并可能造成极其严重的后果。有时碱基替换使 RNA 上的一个密码子变为 UAG、UAA 或 UGA 三个终止密码子中的一个，肽链的延长停止，这种碱基替换称为无义突变。

2. 移码突变

在碱基序列中增加或减少一个或几个碱基对被称为移码突变。移码突变可分成为两类，即插入和丢失。插入过程是在碱基序列中插入一个新的碱基。这样的改变不只是牵涉一个密码子的改变，而是使插入的碱基后面的整个 DNA 上的密码子都被改变了。丢失的过程是在碱基序列中丢失一个碱基，这样的改变同插入一样，使丢

失的碱基后面的 DNA 上的密码子全部与原先的不一样了。

（二）基因突变的诱发及修复

除了 DNA 复制错误造成碱基的替换、插入或缺失等自发突变（spontaneous mutation）外，一些外界因素如某些致癌因子、化学诱变剂（如苯、亚硝酸盐等烷化剂、碱基类似物、修饰剂）、X 射线、放射性辐射、病毒感染等都可能引起基因发生突变。在生物长期进化过程中，生物细胞也形成了一套 DNA 损伤或突变的修复机制。它通过各种酶系统和其他物理化学方法来修复和纠正偶然发生的 DNA 复制错误或 DNA 的损伤。DNA 损伤修复方式包括：光修复、切除修复、重组修复和再生。细胞的修复系统是 DNA 的一种安全保障体系，使 DNA 受到损伤的结构大部分得以恢复，降低了突变率，保持了 DNA 分子的相对稳定性。

（三）基因突变与疾病

基因突变改变了蛋白质（酶）的结构与功能，可能使生物体的形态、结构、代谢过程和生理功能等特征发生改变，严重的突变则影响生物体的生活力或导致生物个体的死亡。

1. 癌症

动物细胞中的癌基因起源于原癌基因。原癌基因是一些与调节和控制细胞生长、分裂和细胞周期相关的基因。有 4 种类型的突变可以将原癌基因转变为癌基因：①基因扩增和增强；②染色体易位；③基因转座；④点突变。基因扩增和增强就是每个细胞中的原癌基因数目比正常细胞多好几倍，产出过量的刺激细胞生长的蛋白。染色体易位和基因转座都使得癌基因被调整到新的连接区，处于一个活性更高的启动子的控制之下，也产出过量的刺激细胞生长的蛋白。点突变则是直接将原癌基因转变，使之表达出编码刺激细胞生长的蛋白，这种刺激细胞生长的蛋白活性更高，比正常蛋白更不易于被降解。

抑癌基因的突变也与癌的发生相关。编码防止细胞过度分裂的蛋白的基因称为抑癌基因。任何使抑癌基因失活或减少表达的突变也会导致癌的发生。

2. 镰状细胞贫血症

患有该贫血症的病人红细胞由正常的圆盘形变成了镰刀状，血液变得很黏稠，红细胞在毛细血管中聚集形成栓塞，导致肾功能衰竭和心血管及脑血管障碍性贫血，最终造成患者的死亡。引起镰状细胞贫血症的原因就是基因的点突变，即编码血红蛋白β肽链上一个决定谷氨酸的密码子 GAA 变成 GUA，使得β肽链上的谷氨酸变成了缬氨酸，引起了血红蛋白的结构和功能发生了根本的改变。

3. 遗传性代谢病

苯丙酮尿症、尿黑酸尿症、痛风、地中海贫血症、血友病甲型、家族性高胆固醇血症、重症肌无力、甲状腺功能亢进等代谢病都是由于基因突变，导致所控制合成的蛋白质结构或数量发生异常，影响到生化反应，导致代谢终止或紊乱而形成的疾病。

黑尿病是由一种隐性基因（al）在纯合子（al / al）时引起病症的发生。黑尿病患者排出的尿遇到空气会变成黑色。这是因为患者尿中含有大量的黑尿酸。这种物质遇到氧就会变成黑色。黑色尿则成为黑尿病人的一种性状了。现已查明，在正常人的血中含有一种酶，它能将黑尿酸分解成为乙酰乙酸，后者再分解成二氧化碳和水。因为黑尿病患者的血清中缺少这种酶，因此，黑尿酸在尿中积累，排出的尿遇到氧时，就变成黑色的了。又如半乳糖血症是由于一种隐性基因 g 所引起的。半乳糖血症患者的基因型为 gg，其体内缺少有活性的使 L-磷酸半乳糖分解的转移酶，致使患病婴孩的红细胞中积累了 L-磷酸半乳糖，结果患者的半乳糖代谢受到障碍，半乳糖不能被利用，血液中半乳糖含量上升到很高的水平。继续发展下去就会使患者的肝肿大，眼睛患白内障，发育不正常，生长迟缓，智力低下。如果不及时治疗，就会导致死亡。

三、基因治疗

（一）基因治疗的概念和策略

基因治疗就是用正常或野生型基因校正或置换致病基因的一种治疗方法。在这种治疗方法中，目的基因被导入到靶细胞内，以补偿或纠正因基因缺陷和异常引起的疾病，以达到治疗的目的。目前

基因治疗的概念有了较大的扩展，凡是采用分子生物学的方法和原理，在核酸水平上开展的疾病治疗方法都可称为基因治疗。

随着对疾病本质的深入了解和新的分子生物学方法的不断涌现，基因治疗有了较大的发展。根据所采用的方法不同，基因治疗的策略大致可分为以下几种。

① 基因置换：基因置换就是用正常的基因原位替换病变细胞内的致病基因，使细胞内的 DNA 完全恢复正常状态。这种治疗方法最为理想，但目前由于技术原因尚难达到。

② 基因修复：基因修复是指将致病基因的突变碱基序列纠正，而正常部分予以保留。这种基因治疗方式最后也能使致病基因得到完全恢复，操作上要求高，实践中有一定难度。

③ 基因修饰：又称基因增补，将目的基因导入病变细胞或其他细胞，目的基因的表达产物能修饰缺陷细胞的功能或使原有的某些功能得以加强。在这种治疗方法中，缺陷基因仍然存在于细胞内，目前基因治疗多采用这种方式。

④ 基因失活：将反义核酸导入细胞内，以碱基配对的方式与目标基因序列结合，抑制或封闭目标基因异常表达或过度表达，达到治疗的目的。如利用反义 RNA、核酶或肽核酸等抑制一些癌基因的表达，抑制肿瘤细胞的增殖，诱导肿瘤细胞的分化。用此技术还可封闭肿瘤细胞耐药基因的表达，增加化疗效果。

⑤ 免疫调节：将抗体、抗原或细胞因子的基因导入病人体内，改变病人免疫状态，达到预防和治疗疾病的目的。如将白细胞介素-2IL-2 基因导入肿瘤病人体内，提高病人 IL-2 的水平，激活体内免疫系统的抗肿瘤活性，达到防治肿瘤复发的目的。

⑥ 其他：增加肿瘤细胞对放疗或化疗的敏感性。采用给予前体药物的方法减少化疗药物对正常细胞的损伤。如向肿瘤细胞中导入单纯疱疹病毒胸苷激酶（HSV-TK）基因，然后给予病人无毒性 GCV 药物，由于只有含 HSV-TK 基因的细胞才能将 CGV 转化成有毒的药物。因而肿瘤细胞被杀死，而对正常细胞无影响。

（二）基因治疗的基本程序

基因治疗是在基因工程基础上发展起来的分子生物学技术，它相对于其他治疗方法较为复杂。基因治疗的基本过程是：分离、克隆正常基因或有治疗作用的核酸片段；选择高效的载体系统并与目的基因进行重组；用携带目的基因的载体转染受体细胞（患者血液或骨髓细胞），使目的基因成为宿主细胞 DNA 的一部分；携带目的基因的细胞在实验室培养后重新输回到患者体内，这类基因治疗称为“体外治疗”。利用载体将目标基因直接运送到患者体内的细胞中，这类基因治疗被称为“体内治疗”。

1. 目的基因的选择和制备

基因治疗的首要问题是选择用于治疗疾病的目的基因。可用于基因治疗的基因需满足以下条件：在体内仅有少量的表达就可显著改善症状；过高表达不会对机体造成危害。所选择的靶基因应在病毒和病原体的生活史中起重要的作用并且序列是特异的。肿瘤病人多有免疫缺陷，可选用免疫因子基因转入人体，也可采用反义技术封闭细胞内活化的癌基因或向细胞内转入野生型抑癌基因。制备目的基因可用传统的方法获取，也可采用 PCR（多聚酶链式反应，polymerase chain reaction）等技术进行体外扩增。

2. 载体的选择

目前多用载体将外源基因运到靶细胞内。使用的载体有病毒载体和非病毒载体两大类。

（1）病毒载体　病毒具有一些独特的性质，如多数病毒可感染特异的细胞；在细胞内不易降解；RNA 病毒能整合到染色体以及基因表达水平较高等。因此病毒载体是良好的基因转运载体，也是基因治疗中最常用的运输工具。然而，大多数野生病毒对机体都具有致病性，因此需要对其进行改造，将致病相关的基因去掉，保留其携带基因进入宿主细胞的功能。经过修饰的病毒载体不能在人体细胞内复制，更不会致病，只能将外源基因带入人体细胞中。目前已被用作载体的病毒有逆转录病毒、腺病毒、疱疹病毒等。病毒载

体仍存在免疫原性高、毒性大、目的基因容量小和靶向特异性差等缺点。

（2）非病毒载体　目前主要是脂质体，一些具有受体功能的载体也呈现出诱人的前景。

3. 靶细胞的选择

理论上讲，无论何种细胞均具有接受外源 DNA 的能力，但目前基因治疗中禁止使用生殖细胞作为靶细胞，只能使用体细胞。用于转基因的体细胞必须取材方便，含量丰富，容易培养，寿命较长。可选择的细胞有淋巴细胞、造血细胞、上皮细胞、角质细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肝细胞、肌肉细胞和肿瘤细胞等。在实际应用时应根据目的、条件选择，即对于不同疾病选用不同类型的靶细胞，如以肝细胞为靶细胞治疗家族性高胆固醇血症、以中枢神经系统细胞为靶细胞治疗帕金森症等。

4. 细胞转染及转化细胞筛选

将目的基因导入靶细胞的方法很多，大致可分为物理方法、化学方法、融合法和病毒感染法四类。目前较多使用的是脂质体法。在目前的技术状态下，一般基因转染效率很难达到 100%。故必须首先将转导细胞和未转导细胞加以区分。常用的转导细胞筛选方法有：利用基因表达产物筛选及分子生物学方法筛选。基因表达产物筛选法有标记基因筛选法、基因缺陷型选择等；分子生物学常用的筛选方法有原位杂交，Southern 杂交和点杂交。PCR 方法目前也已用于转导细胞的鉴定，且该法相对简单易行。

5. 外源基因的表达及检测

在筛选出转化细胞后还需要鉴定外源基因的表达状况。基因的高效表达是一个非常复杂的问题，它受 DNA 拷贝数、转录有效性、mRNA 的加工和稳定性、翻译有效性以及蛋白质加工、分泌等多方面因素的影响。

常用鉴定方法有原位杂交，Northern 杂交，免疫组织化学染色等，前几项是检测外源基因转录出的 mRNA，后者则是检测外源基因翻译出的蛋白质。流式细胞仪是一种较为客观准确的仪器，

可定量分析外源基因的表达状况。

（三）基因治疗的现状与前景

进行基因治疗必须具备下列条件：①了解疾病发病机理及相应基因的结构功能；②纠正该病的基因已被克隆，并了解该基因表达与调控的机制与条件；③该基因具有适宜的受体细胞并能在体外有效表达；④具有安全有效的转移载体和方法以及可供利用的动物模型。近三年来，已对若干人类单基因遗传病和肿瘤开展了临床的基因治疗。

1. 联合免疫缺陷综合征

1991 年美国批准了人类第一个对遗传病进行体细胞基因治疗的方案，即将腺苷脱氨酶（ADA）导入一个 4 岁患有严重联合免疫缺陷综合征（SCID）的女孩。采用的是反转录病毒介导的间接法，即用含有正常人腺苷脱氨酶基因的反转录病毒载体培养患儿的白细胞，并用 IL-2 刺激其增殖，经 10 天左右再经静脉输入患儿。大约 1～2 月治疗一次，8 个月后，患儿体内 ADA 水平达到正常值的 25%，未见明显副作用。此后又进行第 2 例治疗获得类似的效果。

2. 黑色素瘤

对肿瘤进行基因治疗是人们早已期望的事，在进行了多方面探索的基础上，发现了肿瘤浸润淋巴细胞（tumor infiltrating lymphocyte，TIL，即能在肿瘤部位持续存在而无副作用的一种淋巴细胞）在肿瘤治疗中的作用，于 1992 年实施了 TNF/肿瘤细胞和 IL-2/肿瘤细胞方案，即分别将 IL-2 基因肿瘤坏死因子（tumor necrosis ractor，TNF）基因导入取自患者自身并经培养的肿瘤细胞，再将这些培养后的肿瘤细胞注射至病人臀部，3 周后切除注射部位与其引流的淋巴结，在适合条件下培养 T 细胞，将扩增的 T 细胞与 IL-2 合并用于病人，结果 5 名黑色素瘤病人中 1 名肿瘤完全消退，2 名 90%的肿瘤消退，另 2 人在治疗后 9 个月死亡。由于携有 TNF 的 TIL 可积于肿瘤处，因而 TIL 的应用提高了对肿瘤的杀伤作用。

3. 其他遗传病

其他遗传病诸如白种人中常见的囊性纤维化的进展很快。此外，对一些遗传病如血友病、地中海贫血、高雪氏病等正在探索中。

目前已批准进行基因治疗的病例约 120 例，其中约 110 例为肿瘤，遗憾的是，除黑色素瘤外，全都未能成功。治疗了 10 余例单基因病，除 ADA 缺乏症和乙型血友病有一定疗效外，其余都还在实验阶段。但人们再也不怀疑基因治疗不仅可能办到，而且指日可待。

基因治疗可用于疾病的治疗，也可用于疾病的预防。基因治疗并不是万能的，尚不能取代现有的治疗方法，作为一种新的方法也还有一些需进一步完善的地方，在实践中应相互结合，取长补短，以取得较好的治疗效果。

第五节　人类基因组计划简介

一、基因组学

基因组（genome）一词由 Winkler 在 1920 年首次提出，意为 gene 与 chromosome 的组合。目前，基因组的含义有了很大的发展，不同的学科有不同的表述。从现代分子生物学的角度来看，基因组是生物整套染色体所包含的 DNA 分子及其所携带的全部遗传信息和指令。不同生物基因组大小及复杂程度不同，具有物种差异性。一般来说，基因组大小和 DNA 含量是随着生物进化复杂程度的增加而逐步上升的。随着生物结构和功能复杂程度的增加，需要的基因数目和基因产物种类越多，因而基因组也越大。

基因组学是研究生物基因组的结构和功能的科学，即从整体水平上来研究一个物种的基因组的结构、功能及调控的一门科学。基因组学可分为结构基因组学和功能基因组学两大部分。

（一）结构基因组学

结构基因组学，就是研究生物基因组结构的科学。它是基因组研究的第一阶段的工作，是建立功能基因组学的基础。主要目标是

绘制生物的遗传图（genetic map）、物理图（physical map）、转录图（transcript map）和序列图（sequence map）。基因组测序是结构基因组学最基本的研究工作，只有完成物种基因组 DNA 的测序，才有可能在碱基水平上破译生物的遗传之谜。迄今已完成了 100 多个物种的基因组 DNA 序列的测定，其中包括大肠杆菌、酵母、秀丽线虫、拟南芥等多个模式生物以及人类基因组的序列。

（二）功能基因组学

功能基因组学是建立在结构基因组学基础上的基因组分析的第二阶段。其主要内容是利用结构基因组学所提供的生物信息和材料，全基因组或全系统地理解某种生物的遗传体系，即阐明 DNA 序列的功能。功能基因组学的研究必须结合计算机科学和统计学，采用高产出和大规模的实验技术。

虽然，科学家们已提出了功能基因组学的概念，并开始了这方面的研究工作，但实际上，基因组学的发展目前还处于结构基因组学的阶段，功能基因组学的研究，还只局限于 RNA 水平。

（三）开展基因组学研究的意义

对于开展大规模基因组结构和功能的分析研究，即基因组 DNA 测序和 DNA 序列的功能分析的意义，在 10 多年前，还有不少人持怀疑的态度。但现在情况有了根本的转变，基因组学的发展必将给生物学和人类社会带来巨大的冲击，引起深刻的变化，这是确定无疑的了。其具体的理论和实际意义如下。

① 通过物种的基因组测序，可以获得其他手段所无法获得的蕴藏在 DNA 分子中的遗传信息，使人们能够从整个基因组结构的宏观水平上了解基因的功能以及它们相互之间在表达调控机制上的联系，加深对生命本质的认识，揭开生命之谜。

② 从整体上了解染色体和基因的空间结构，以及它们对 DNA 复制、基因转录和表达调控的影响和作用。

③ 通过基因组测序，可以比较不同物种之间在 DNA 序列和基因结构上的差异，使人们能够在基因组的整体水平上认识生物的起源和进化。

④ 研究突变、重排和染色体断裂等方面的 DNA 病理改变，了解人类各种疾病的分子机理，为诊断、预防和治疗这些疾病提供理论依据。

⑤ 研究家畜和各种农作物经济性状的基因结构以及基因在染色体上的位置，为开展分子育种工作提供理论依据。

（四）动物基因组研究现状

动物基因组研究大致可以分为以下层次或阶段，即遗传图谱和物理图谱的建立、经济性状基因的定位、DNA 序列测定等。

1. 遗传图谱

遗传图谱是指阐明各基因或 DNA 标记之间连锁关系和染色体定位的图谱，又称为连锁图谱。连锁图谱的建立可把某一基因定位在一已知区域，再对基因进行分离和研究。

2. 物理图谱

物理图谱是指阐明各基因或 DNA 标记之间的精确距离的图谱。物理图谱反应的是 DNA 序列上两点之间的实际距离，而遗传图谱则反应这两点之间的连锁关系。DNA 物理图谱实际上就是 DNA 链的限制性酶切片段的排列顺序，即酶切片段在 DNA 链上的定位。

3. 基因定位

基因定位就是将控制动物各表型性状的基因准确地确定其在染色体或基因组上的位置。它的原理是基因的重组和交换。若在染色体或基因组上控制一个表型性状的基因附近有 DNA 多态性标记，那么在遗传过程中尽管该基因可能与控制其他表型性状的基因发生分离重组，也可以根据 DNA 标记找到这个基因。因此，有大量的 DNA 标记和有关的信息是基因定位的基础。

4. DNA 序列测定

动物的经济性状多数是基因组中许多基因在复制、转录、转录后加工、翻译、翻译后加工等多个层次上，并在不同的时间和空间上进行表达、相互调节和相互作用的结果。这是一个高度错综复杂的过程，只有获得基因组的全部 DNA 序列的信息后，才能在整个

基因组水平上认识、调控和利用这些基因。

5. 利用基因组分析的信息，开展动物育种工作，改良动物的生产性能是动物基因组研究的最后一个层次，也是研究的最终目的。

二、人类基因组计划

人类基因组计划（human genome project，HGP）是由美国科学家 Renato Dulbecco 于 1985 年率先提出，于 1990 年正式启动，由美国、英国、法国、德国、日本和我国科学家共同参与的一项国际合作计划。人类基因组计划与曼哈顿原子弹计划和阿波罗登月计划并称为三大科学计划。HGP 的主要任务是对构成人类基因组的 23 对染色体的 30 多亿个碱基进行精确测序，发现所有人类基因并确定其在染色体上的位置，破译人类全部遗传信息。HGP 还包括对五种“模式生物（大肠杆菌、酵母、线虫、果蝇和小鼠）”基因组的研究，旨在从这些相对简单的模式生物及较小的基因组测序实验中，发展有利于人类基因组测序的策略和新技术。我国得到完成人类 3 号染色体短臂上一个约 30Mb 区域的测序任务，该区域约占人类整个基因组的 1%。

HGP 的主要内容包括遗传图谱、物理图谱、序列图谱、基因图谱四张图谱的绘制，还有发展基因组研究的新技术，完善人类基因组研究涉及的伦理、法律和社会问题，培训能利用 HGP 发展起来的技术和资源进行生物学研究的科学家，促进人类健康。HGP 最终完成图要求测序所用的克隆能忠实地代表常染色体的基因组结构，序列错误率低于万分之一。95%常染色质区域被测序，每个 Gap 小于 150kb。

2000 年 6 月 26 日，参加人类基因组工程项目的美国、英国、法国、德国、日本和中国的 6 国科学家共同宣布，人类基因组草图的绘制工作已经完成。

2001 年 2 月 12 日，美国 Celera 公司与人类基因组计划分别在《科学》和《自然》杂志上公布了人类基因组精细图谱及其初步分析结果，两者的结果惊人的相似。

整个人类基因组测序工作的基本完成，为人类生命科学开辟了一个新纪元，它对生命本质、人类进化、生物遗传、个体差异、发病机制、疾病防治、新药开发、健康长寿等领域，以及对整个生物学都具有深远的影响和重大意义，标志着人类生命科学一个新时代的来临。

在新公布的人类基因组图谱中，有许多十分惊人的发现以及重要数据。分析得知，人类全部基因组约有 2.91Gb，约有 3.9 万个基因，平均基因大小约 27kb，到目前仍有 9%的碱基对序列未被确定，19 号染色体是含基因最丰富的染色体，而 13 号染色体含基因量最少。目前已经发现和定位了 2.6 万个功能基因，其中尚有 42%的基因的功能尚不清楚，在已知基因中酶占 10.28%，核酸酶占 7.5%，信号传导占 12.2%，转录因子占 6.0%，信号分子占 1.2%，受体分子占 5.3%，选择性调节分子占 3.2%。人类基因数量只是线虫或果蝇的两倍，人有而鼠没有的基因只有 300 个。人类单核苷酸多态性的比例约为 1/1250bp，不同人群仅有 140 万个核苷酸差异，人与人之间 99.99%的基因密码是相同的。并且发现，来自不同人种的人比来自同一人种的人在基因上更为相似。在整个基因组序列中，人与人之间的变异仅为万分之一，从而说明人类不同“种属”之间并没有本质上的区别。人类基因组上大约有 1/4 的区域是没有基因的片段。在所有的 DNA 中，只有 1%～1.5% DNA 能编码蛋白，在人类基因组中 98%以上序列都是所谓的“无用 DNA”，分布着 300 多万个长片段重复序列。这些重复的“无用”序列，决不是无用的，它一定蕴含着人类基因的新功能和奥秘，包含着人类演化和差异的信息。男性的基因突变率是女性的两倍，而且大部分人类遗传疾病是在 Y 染色体上进行的。所以，可能男性在人类的遗传中起着更重要的作用。

找到了一批与人体疾病相关的重要基因，如肥胖、糖尿病、高血压、支气管哮喘等基因。这些基因的发现，增进了人们对许多重要疾病机理的理解。

酵母、大肠杆菌、果蝇、线虫、小鼠、拟南芥、水稻、玉米等

其他一些模式生物的基因组计划也都相继完成或正在顺利进行。

HGP 的实施和完成为疾病的基因诊断、基因治疗、疾病预防、疾病易感基因的识别、药物的靶点筛选及个体化的药物治疗等研究奠定了基础；对基因工程药物、基因和抗体试剂盒、诊断和研究用生物芯片等的研制具有重要指导意义；对于基因表达调控、细胞生长分化、生物遗传与进化等基础科学研究将产生巨大的推动作用；HGP 还将为人类社会带来巨大的社会和经济效益。

HGP 给人类带来巨大利益的同时，也带来一系列的问题。如 HGP 所引发的基因专利战及基因资源的掠夺战；如何平衡隐私和基因组公平使用之间的关系；更危险的是 HGP 的成果可能被用于研制和生产种族选择性灭绝性生物武器。

第六节　生物的进化

一、生命的起源

生命起源是当代最大的科学难题之一，也是充满争论和神秘色彩的领域，对于这一问题人们提出了许多假说，但任何学说都无法科学、圆满地解释生命起源诸多未解之谜。在这些学说中，生命的化学进化学说最具说服力。化学进化学说认为，地球上原来没有生命，是由非生命物质变化发展而来。这一变化分为两个阶段，即生命系统诞生之前，为生命的诞生准备有机材料的“化学进化”阶段，及生命诞生之后，由低级到高级、由简单到复杂的“生物进化”过程。

生命起源是一个漫长的历史过程。地球形成之初，只存在甲烷、氨、氢等小分子无机物。这些无机物在紫外光、电离辐射、雷电等能量作用下，通过长时间的化学演化，逐步生成了核苷酸、氨基酸等有机小分子物质，这些有机小分子汇集在原始的海洋中，成为一种“有机汤”。这个过程已经被科学家用放电实验室重现出来。此后，“有机汤”中的有机小分子，经过长期的相互作用，在适当条件下进行缩合或聚合反应，逐步形成蛋白质、核酸等有机高分子物质。人们模拟原始地球的条件，也已再现了类似的过程。随着海

洋中的蛋白质、核酸分子越积越多，浓度增加，在某种情况下，又被分离、凝聚成小滴，并脱离原来的海洋环境，构成可与外界进行简单物质交换的多分子体系——类似液泡的团聚体或微球体，最终出现了有原始陈新代谢功能并进行自我繁殖的最早生命。但科学家尚未通过科学实验验证此过程。

二、生物进化

进化（evolution）是指生物在与其生存环境相互作用过程中，生物种群的遗传结构随时间而发生一系列的改变，并导致相应的表型的改变，从而引致生物种群在多样性和适应性上的变化；也就是说，进化是从地球上原已存在的生命形式逐渐产生新的类型的变异过程。生物的进化是个缓慢而漫长的过程。

（一）生物进化的证据及历程

生物进化的证据就是关于地球上各种生物都是通过长期的进化发展而形成的历史事实，有直接证据和间接证据。

1. 古生物学证据

生物进化的最直接的证据是地质史中的化石记录。化石是在自然的作用下保存在地层中的古生物遗体、遗物及生活遗址。古生物学是研究各种地质时期不同地层中化石的科学。

按地层形成的历史顺序，地质时期可分为若干宙、代、纪。不同时期的古生物化石为人们提供了古生物演变的历史记录。根据不同地层时期古生物化石的记录，可以知道各类生物出现的时间顺序。越晚越近地层里出现的生物化石与现存生物越相似。早期出现的生物种类少而简单，晚期出现的种类则多而复杂。并且各种生物出现后往往有一个最盛时期，以后逐渐衰亡或灭绝。

太古宙末期是目前有化石记录的最早时期，只有一种距今大约30亿年的原核生物细菌的化石。到了元古宙，开始发现了一些原始动植物遗迹。动物从单细胞类型，发展为多细胞类型，主要是原生动物、多孔动物和腔肠动物，后发展为真核生物。最早的真核生物化石可以追溯到12亿～14亿年前。在古生代地层中出现了大量的动物化石。初期是水生无脊椎动物及藻类，比较繁盛。而后来约

在4亿年以前，出现了最早的脊椎动物——甲胄鱼类。古生代中期是鱼类盛行时期。距今约3亿年前，出现了两栖类。到了古生代晚期，为两栖类极盛行时期，同时出现了爬行类。在植物方面，古生代中期出现了蕨类。原始的种子蕨类，叶子像蕨类，茎像裸子植物，而果实又像种子植物。中生代是裸子植物和爬行类动物的时代，尤其是恐龙的全盛时期。在距今2亿年前，出现了鸟类和哺乳类。新生代，是现代生物类型出现和发展的时期。鸟类、哺乳类和被子植物获得空前大发展。大约在200万～300万年前，古代猿类中的一个分支向人类发展，出现了猿人。从这时起，地球的历史逐渐进入人类时代。

2. 生物化学证据

生物化学分析表明，现存生物除病毒、类病毒及朊病毒外都由细胞构成；整个生物界都是由蛋白质和核酸组成；现存生物代谢途径、能量转化利用形式等非常相似。这些共同的特征说明生命具有共同起源。

生物化学的研究为阐明生物之间的亲缘关系提供了可靠的线索。人们分析了近100个生物种属的细胞色素C的化学结构。结果表明亲缘关系越近，其结构越相似；亲缘关系越远，结构差异越大。因此可以根据细胞色素C结构上的差异，断定生物亲缘关系的远近。

生物进化是从低级向高级，从简单向复杂发展的。可以推断，DNA含量随生物进化不断增加。生化分析的结果表明，由病毒到哺乳动物的进化过程中DNA含量增加了许多。因此，可以说遗传物质DNA含量的增加是生物从简单到复杂进化的重要证据。事实上，很多基因在高等生物的细胞中才有，如血红蛋白和免疫球蛋白等基因。

血清学方法是证明动物间有血缘关系的经典方法。例如用人血清作为抗原注射到家兔体内产生抗体后，再观察家兔抗血清与各种动物的抗原抗体反应，可检测人与这些动物间的亲缘关系。亲缘关系越近，反应越强烈，形成的沉淀越多。

除上述两个方面外，生物进化的证据还有很多，如胚胎学、比较解剖学、分类学、动物地理学等，它们都可以从不同角度说明地球上现有的生物是从原始生物逐渐进化而来的。

3. 生物进化的历程

生物进化的历程就是生命发生发展的过程。生命发展的总趋势是由少到多，由简单到复杂。

（二）生物进化的机制

生物进化是生命科学一个重要的课题和研究领域。关于生物进化的思想和理论，有着一个漫长的发展过程。把生物进化作为一门科学进行探讨，并首次提出系统进化学说的是拉马克。半个世纪后，达尔文创立了科学的生物进化论。此后，遗传学又对进化论进行修饰和发展。因此，现代进化论的主要理论来源主要包括三方面的内容，即拉马克的进化学说、达尔文进化论和孟德尔遗传学。

1. 拉马克的进化学说

拉马克（J. B. Lamarck，1744—1829）是法国伟大的博物学家，从事植物学、动物学和古生物学等方面的研究，1809 年他在《动物学哲学》一书中完整地提出了自己的进化学说。

拉马克认为生物进化是由低级到高级、由简单到复杂的一个等级逐步向上的发展过程。拉马克列举了大量事实说明生物物种是可变的，所有现存的物种，包括人类，都是从其他物种传衍、变化而来；而生物的变异和进化是连续的渐变过程。拉马克还相信生命的“自然发生”说和生物进化多源论。

拉马克认为环境的改变使生物发生适应性的变异和进化，这种变化是可遗传的，即获得性遗传。环境的多样性是生物多样性的主要原因。许多家养动物和栽培植物与相应的野生动植物有别，是因为所处环境条件不相同。外界条件对生物的影响有两种形式：对于植物和低等动物，这种影响是直接的；对于具有发达神经系统的高等动物，这种影响则是间接的，当外界环境条件改变时，首先引起动物习性和行为的改变，然后促使某些器官在使用上的加强或削弱，这样由于用进废退和获得性遗传，生物逐步得到发展。

2. 达尔文的进化学说

查尔斯·达尔文（Charles Robert Darwin）1809 年 2 月 12 日出生于英国，1831 年 12 月 27 日参加英国海军水文地理战舰“Beagle”号的科学考察，达尔文在历时五年的科学探险活动中使收集到大量关于生物进化的第一手材料。后经多年的刻苦研究，于 1859 年 11 月 24 日出版了举世闻名的《物种起源》一书。达尔文进化论的核心内容如下。

（1）遗传与变异　生物个体会发生变异，有些变异能遗传，有些不能遗传。这些可遗传的变异是随机产生的。

（2）繁殖过剩　生物都具有繁殖过剩的倾向，即每个物种都产生比能够生存下来的多得多的后代。但每个物种的群体都保持相对稳定。

（3）生存斗争与适者生存　一个物种的生存空间和食物都是一定的，它们必须为生存和繁殖后代而斗争。他认为适者生存，不适者被淘汰，种群内有利生存的变异被保持下来并能传递给自己的后代，不利于生存的个体则将被消灭掉或者是不能繁殖后代。长期的定向选择，微小的变异得到积累而成为显著的变异，最终可能导致新种的形成。这是自然选择，起主导作用的是自然界。人工选择则可根据人类的生产目的选择出符合需要的新品种。选择是生物进化的重要动力。

达尔文还认为生物之间都有一定的亲缘关系，它们有着共同的祖先。现存的物种是从过去存在的物种传衍、进化而来。物种是不断变异和进化的，新种在不断产生，旧种在逐渐消灭。生物的进化是逐渐和连续的。他当时错误地认为不存在不连续的变异或突变。达尔文还强调了地理隔离对新种形成的促进作用。

3. 综合进化论

20 世纪遗传学和细胞学的发展，促使人们对达尔文进化论进行修正，形成了现代达尔文主义或称现代进化论。综合进化论的代表作是 T. Dobzhansky（1900—1975 年）1937 年出版的《遗传学与物种起源》及 1970 年出版的《进化过程的遗传学》。

他论证了突变、基因重组、选择和隔离四个因素在生物进化中的作用，认为物种形成和生物进化的单位是种群，而不是单个的个体。综合进化论发展了群体进化的概念，认为进化是群体在遗传组成和性状上的变化。群体中发生的变异包括有性生殖过程中发生的基因重组、突变、新基因的引入以及群体原有基因的迁出等。

4. 分子进化的概念

分子进化是指发生在生物分子层次上的进化。20 世纪 50 年代以前，人们主要是用古生物学、分类学、胚胎学、比较解剖学、生物地理学、生理学和遗传学等方面的知识来证明生物进化的事实。20 世纪 50 年代以后，随着分子生物学和分子遗传学的兴起，检测生物 DNA 分子的核苷酸序列和各种多肽的氨基酸序列的技术得到了普及，生物学家开始从分子水平研究生物进化的原因和机制，并取得了显著的进展。

在分子水平上，进化过程涉及 DNA 中发生插入、缺失、倒位、核苷酸替换等变异。如果发生变异的 DNA 片段编码某种多肽，那么这类变异就可能使多肽链中氨基酸序列发生变化。在长期的进化过程中，这些变异就会被积累起来，形成与其祖先存在很大差异的分子。因此，在核酸和蛋白质分子组成的序列中，蕴藏着大量生物进化的遗传信息。在不同物种间，从相应的核酸和蛋白质组成成分的差异上，可以估测它们之间的亲缘关系。凡彼此间所具有的核苷酸或氨基酸越相似，则表示其亲缘关系越近；反之，其亲缘关系就越远。根据各种生物在分子水平上的进化关系，可以建立分子进化的系统树。

日本学者 Kimura 等于 1968 年提出了“分子进化中性论”的理论，用以解释分子层次上的“非达尔文式进化”现象。分子进化中性论的中心论点是：生物在大分子层次上的进化改变，不是由于自然选择作用于有利突变而引起的；而认为绝大多数的分子层次上的变化在选择上是中性的或非常接近中性的，等位基因频率的逐代变化，只是起因于在连续的突变压之下，逐代的随机抽样误差，也

即是起源于遗传漂变。

中性论揭示了分子进化的基本规律，是解释生物大分子进化现象的重要理论。中性论强调遗传漂变和突变压在分子进化中的作用，是对综合进化论的重要补充和修正。中性论承认自然选择在表型进化中的作用，同时又强调分子层次上进化现象的特殊性。

三、人类的起源与进化

原始的人类出现大约开始在距今约 300 万～200 万年以前。智力和文化的发展是人类进化发展的重要标志。人类进化的历程是：南猿（440 万～100 万年前）→ 能人或早期猿人（200 万～175 万年）→ 直立人（200 万～20 万年）→ 智人（25 万年，即现代人）。人类发展的各个阶段并不是像台阶那样截然分明，而是在时间上有一定的重叠。

南方古猿是由猿分化出来的最原始的人科代表，代表了由猿到人演化过程的过渡阶段。南方古猿具有猿和人的混合特征，能直立行走。它们生活在距今 440 万～100 万年期间的东非和南非等地。它们的脑容量变化范围由早期的 450 毫升到晚期的 725 毫升。它们可能像现代的类人猿一样具有即兴使用树枝、木棍、石块的能力，但缺乏有意识制造工具的能力。

大约在距今 200 万年前后，由南方古猿演化出了最早使用和有意识制造石器的原始人类——能人。他们生活在距今 200～175 万年期间，代表了人类演化历史中的早期猿人阶段。他们的平均脑容量约 640 毫升。目前为止，这一演化阶段的人类化石和文化遗址主要分布在东非地区和我国的云南省。

直立人分布范围相当大（亚洲、非洲、欧洲），脑量继续增大，已能近似现代人那样地完全两足直立行走，已能制造旧石器，并已开始用火，大约生存在距今 200 万～20 万年前。

早期智人大约从 25 万年前开始，逐渐发展成为现代全世界各色人种，在文化上，他们已有雕刻和绘画的艺术，出现了装饰品。

根据肤色、发形等体质特征把全世界的人划分为 4 个人种：

① 蒙古利亚人（Mongoloid）或称黄种人；

② 高加索人（Caucasoid）或称白种人；

③ 尼格罗人（Negroid）或称黑种人；

④ 澳大利亚人（Australoid）或称棕种人。

第四章　微　生　物

从生命的出现距今约有 30 多亿年的历史。经历几十亿年的发展进化，地球上形成了丰富多彩的生命世界。根据分类学记载，地球上生活着的生物约有数百万种，数量庞大，分布广泛。它们在大小、形态结构、营养生殖方式、生态适应等方面都存在着差异。其中，有关高等动、植物的结构功能和生长发育等相关内容，大家已非常熟悉。因此本章将重点介绍现代微生物学的基本内容。

微生物是一大类形体微小、个体结构简单的低等生物的总称。人们通常会借助显微镜或者电子显微镜才能看清它们的形态和结构。它们具有体形微小、结构简单、数量多、分布广泛、繁殖迅速、容易变异及适应环境能力强等优点。绝大多数微生物对人类和动、植物的生存是有益而必需的。自然界中氮、碳、硫等多种元素循环靠微生物的代谢活动来进行。没有微生物，植物就不能新陈代谢，而人类和动物也将无法生存。人类还广泛利用一些微生物的特性，在农业、工业、医药、化工等领域对其加以利用和生产。但是有一小部分微生物能引起人类或动、植物的病害，这些具有致病性的微生物称为病原微生物。

第一节　微生物类群与形态结构

在自然界，微生物是个十分庞大复杂的类群，根据其进化水平和性状上的明显差别可分为非细胞微生物、原核微生物和真核微生物三大类群。非细胞微生物主要包括病毒、类病毒和朊病毒。原核微生物主要包括细菌、放线菌、支原体、衣原体和蓝细菌（蓝藻等）。真核微生物主要包括真菌界的酵母菌、霉菌、原生动物和显微藻类。这里，主要介绍细胞型微生物的代表生物，非细胞微生物将在后面单独介绍。

一、细菌

细菌是微生物一大类群，在自然界分布很广，种类多，与人类的关系极为密切，是微生物学的主要研究对象。

1. 细菌的形态

细菌是在自然界分布最广、个体数量最多的有机体，是大自然中物质循环的主要参与者。细菌主要由细胞壁、细胞膜、细胞质、核质体等部分构成，有的细菌还有荚膜、鞭毛、菌毛等特殊结构。绝大多数细菌的直径大小在 0.5～5μm 之间。尽管细菌种类多，其基本形态可分为球状、杆状与螺旋状三种。其中球状菌的排列方式在分类学上有重要意义。杆状菌是细菌中种类最多的，工农业生产所用的细胞大多是杆菌。

2. 细菌细胞的结构

（1）细胞壁　细胞壁位于细胞表面，具有保护细胞免受机械或渗透压的破坏。用革兰染色法，可以把细菌区分为革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类。革兰染色法要点：先用结晶紫染液染色，再加媒染剂——碘液处理，使菌体着色，然后用乙醇脱色，最后用复染液（沙黄或番红）复染，菌体呈红色者为革兰阴性菌，呈深紫色者为革兰阳性菌。这两类细菌细胞壁的构造成分上差别较大，导致致病机理也不同。细胞壁上有附属结构，如鞭毛。用溶菌酶处理细胞或在培养基中加入青霉素，可破坏或抑制细胞壁的形成。

（2）细胞膜　原核细胞膜内陷或折叠成囊状结构，叫间体。相当于高等生物的线粒体，可能是呼吸作用的电子传递系统的中心。

（3）细胞质　细胞质中有许多酶和一些核糖体。能进行光合作用的光合细菌细胞质内含有色素体。固定二氧化碳的细菌胞质中有羧酶体。此外还有气泡和颗粒状物质。

（4）拟核　原核细胞没有核膜，DNA 集中在细胞质中的低电子密度区，称核区或拟核。细菌一般具有 1～4 个核质体，多的可达 20 余个。核质体是环状的双链 DNA 分子，所含的遗传信息量可编码 2000～3000 种蛋白质，空间构建十分精简，没有内含子。由于没有核膜，因此 DNA 的复制、RNA 的转录与蛋白质的合成

可同时进行，不像真核细胞那样这些生化反应在时间和空间上严格分隔开来。

（5）质粒　细菌核区 DNA 以外的，可进行自主复制的遗传因子，称为质粒（plasmid）。绝大多数质粒是裸露的共价闭合环状双螺旋 DNA 分子，所含遗传信息量为 2～200 个基因，能进行自我复制、稳定遗传，可携带外源基因，改造后是基因工程常用的载体。

（6）芽孢　某些细菌处于不利的环境，或耗尽营养时，形成内生孢子，又称芽孢，是对不良环境有强抵抗力的休眠体。芽孢在化学成分、结构生理功能等与母细胞完全不同。有些细菌体内同时还伴随产生伴胞晶体，多肽类内含物，有毒。

（7）其他结构　许多细菌的最外表还覆盖着一层多糖类物质，边界明显的称为荚膜，如肺炎球菌荚膜对细菌的生存具有重要意义，细菌不仅可利用荚膜抵御不良环境；保护自身不受白细胞吞噬；而且能有选择地黏附到特定细胞的表面上，表现出对靶细胞的专一攻击能力。

鞭毛是某些细菌的运动器官，由一种称为鞭毛蛋白的弹性蛋白构成。细菌可以通过调整鞭毛旋转的方向（顺时针和逆时针）来改变运动状态。

菌毛是菌体表面极其的蛋白纤细，须用电镜观察，特点是细、短、直、硬、多，菌毛与细菌运动无关，与细菌吸附和侵染宿主、传递遗传物质有关。

3. 细菌的繁殖

裂殖是细菌最普遍、最主要的繁殖方式，少数细菌和酵母菌一样，进行出芽繁殖。近年来，通过电子显微镜观察和遗传学研究证实，少数细菌种类也存在有性接合，但频率很低。

二、放线菌

放线菌是介于细菌与丝状真菌之间而又接近于细菌的一类丝状原核生物，因菌落呈放射状而得名。放线菌广泛存在于自然界，多为腐生，少数寄生，与人类关系十分密切。放线菌最突出的特性之

一是能产生大量的、种类繁多的抗生素。

1. 放线菌的形态结构

放线菌菌体为单细胞，大都由分支发达的菌丝组成。菌丝结构与细菌基本相同，根据菌丝形态和功能可分为营养菌丝、气生菌丝和孢子丝三种。营养菌丝主要的生理功能是吸收营养物，故也称基内菌丝，营养菌丝有的能产生不同颜色的色素，将培养基染上相应的颜色。营养菌丝发育到一定时期，向培养基外空延伸成气生菌丝。当气生菌丝发育到一定程度，其上可分化出可形成孢子的菌丝即孢子丝，孢子丝生长到一定阶段可形成孢子。如此周而复始，放线菌通过形成无性孢子的方式进行繁殖，得以生存发展。

2. 放线菌的代表属

（1）链霉菌属（*Streptomyces*） 具有发育良好的菌丝体，分支，无隔膜。主要生长在含水量较低，通气较好的土壤中。由放线菌产生的抗生素，90%都是由链霉菌属产生的。著名常用的抗生素有链霉素、土霉素、丝裂霉素、制霉菌素、卡那霉素等。改变链霉菌的营养，可能导致抗生素性质的改变。

（2）诺卡菌属（*Nocardia*） 菌丝体产生横隔膜，此属中多数种无气生菌丝。主要分布于土壤，能产生 30 多种抗生素。另外，有些诺卡菌用于石油脱蜡、烃类发酵以及污水处理。

（3）放线菌属（*Actinomyces*） 多为致病菌，只有营养菌丝。一般为厌气菌。

（4）小单孢菌属（*Micromonospora*） 不形成气生菌丝，只在营养菌丝上长出很多分支小梗，顶端着生一个孢子。一般为好气性腐生，也是产抗生素较多的一个属，如庆大霉素、利福霉素等。此种产生抗生素的潜力较大。

（5）链孢囊菌属（*Steptosporangium*） 主要特点是形成孢子囊和孢囊孢子。因其不少种可产生广谱抗生素而受到重视。

三、蓝藻（*cyanobacterium*）

蓝藻又称蓝细菌，属单细胞生物，有些蓝藻经常以丝状的细胞群体存在，蓝藻细胞的体积比其他原核细胞大得多，直径一般在

10μm，甚至可达 70μm（颤藻）。蓝藻的遗传信息载体与其他原核细胞一样，是一个环状 DNA 分子，但遗传信息量很大，可与高等植物相比。蓝藻没有叶绿体，仅有十分简单的光合作用结构装置，但能进行与高等植物类似的光合作用，与光合细菌的光合作用机制不一样，因此被认为是最简单的植物。可自生固氮，也可共生固氮。种类很多，代表属有微囊藻属（*Microcystis*）、鱼腥藻属（*Anabaena*）、单歧藻属（*Tolypothrix*）和颤藻属（*Oscillatoria*）。

四、酵母菌（yeast）

酵母菌主要分布在含糖质较高的偏酸性环境，多为腐生型，少为寄生型。人类对它的应用很早，在四千多年前我国就用酵母菌酿酒，以后逐渐用来发酵果汁、面包、馒头等美味食品；今天酵母菌的用途更加广泛，用于生产菌丝蛋白、提取核苷酸、辅酶 A、细胞色素 C、核黄素等。酵母菌也常给人类带来危害：引起人或动物发生病害；食物、纺织品及其他原料腐败变质。

1. 酵母菌的形态结构

酵母菌是一群单细胞的真核微生物，一般呈卵圆形、圆形、柠檬形等。大小约（1～5）μm×（5～30）μm，有些酵母菌细胞与其子代细胞连在一起成为链状，称为假丝酵母。酵母菌的细胞壁分为三层，外层为甘露聚糖，内层为葡聚糖，中间为蛋白质分子。酵母菌的细胞膜与原核生物基本相同。但是酵母菌的细胞核由双层单位膜构成，核内有可见的染色体，核膜上具有核孔，是核内外物质交换的通道。核内的 DNA 以染色体的形式存在，酵母细胞核内有 17 条染色体。

2. 酵母菌的繁殖方式

酵母菌的繁殖方式有无性繁殖和有性繁殖两种。无性繁殖又分为芽殖、裂殖、节孢子、厚垣孢子。有性繁殖方式主要是产生子囊孢子。凡具有性繁殖产生子囊孢子的酵母称为真酵母，尚未发现有性繁殖方式的称为假酵母。

五、霉菌（mould）

霉菌是一些丝状真菌的统称，属于真核微生物，在自然界分布

极广、土壤、水域、空气及动植物体内外均有它们的踪迹。它们生长在黑暗、潮湿以及有机物质丰富的环境下。它能产生丰富的酶，具有很强的分解复杂有机物的能力。

霉菌在发酵工业上被广泛用来生产酒精、抗生素、有机酸、酶制剂、维生素、激素等；农业上用于饲料发酵、植物生长激素、杀虫农药等；在自然界的物质转化中，霉菌起着非常重要的作用。霉菌对人类的危害也是极大的。霉菌的营养来源主要是糖类和少量氮、矿物盐类等，故极易在含糖的食品、饼干、面包和各种谷物、水果上生长，有的还产生毒素，严重威胁人畜健康。毒性最强的是黄曲霉（*Aspergillus flavus*），产生的黄曲霉毒素（*alfatoxin*）可致癌。

1. 霉菌的形态结构

霉菌菌体由分枝或不分枝的菌丝组成，许多菌丝交织在一起称菌丝体。真菌的菌丝是由硬壁包围的管状结构，直径约 2～10μm，内含可流动的原生质。菌丝有两类：①无隔膜菌丝，细胞质内含有多个核，其生长过程只表现为菌丝的延长和细胞核的裂殖增多以及细胞质的增加，如根霉（*rhizopus*）、毛霉（*mucor*）；②有隔膜菌丝，菌丝由横隔膜分隔成成串细胞，每个细胞内含有一个或多个细胞核，如青霉（*Penicillium*）、曲霉（*Aspergillus*）。菌丝已分化为营养菌丝、气生菌丝、繁殖菌丝。菌丝在长期适应不同外界环境条件的过程中，产生了不同类型的变态。这些变态的菌丝在长期演化过程中被赋予特殊的功能。

霉菌菌丝细胞均由细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核、线粒体、核糖体以及内含物组成。大多数真菌，包括霉菌，细胞壁主要成分由几丁质组成，几丁质是由 *N*-乙酰葡糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸构成双糖单元，以 β-(1→4) -糖苷键连接成大分子而成的。细胞膜外表面有糖类存在，具有细胞间识别受体功能。具有形态完整、有核膜包裹的细胞核，它对细胞生长、发育、繁殖和遗传、变异等起着决定性的作用。另一些结构组成与其他真核细胞基本相同，如内质网、核糖体、线粒体、高尔基体、溶酶体、微体、液泡等。

2. 霉菌的繁殖

霉菌的繁殖能力很强，而且方式多样。菌丝的碎片或菌丝截断均可发育成新的菌丝体，一般称此为断裂繁殖，但在自然界，霉菌主要靠形成无性孢子和有性孢子繁殖。一般霉菌菌丝生长到一定阶段，先进行无性繁殖，到后期在同一菌丝体产生有性繁殖结构，形成有性孢子。有性繁殖过程可分为三个阶段：质配、核配和减数分裂。

3. 霉菌的主要代表属

(1) 根霉

属于接合菌亚门、接合菌纲、毛霉目、毛霉科。自然界分布极广。根霉在营养菌丝体的匍匐枝上生出特有的假根，其上生出多根孢囊梗，梗端膨大形成孢子囊，囊内生孢囊孢子。根霉的用途很广，产生淀粉酶的能力强，被作为淀粉质原料酿酒的糖化菌。还能用来产生有机酸如反丁烯二酸、乳酸、琥珀酸等，代表种有黑根霉、米根霉、华根霉等。

(2) 毛霉

分类地位同根霉。毛霉的菌丝体在基质内或基质外能广泛的蔓延，无假根及匍匐枝，孢囊梗直接由菌丝体生出，一般单生不分枝或有较少分枝。毛霉的用途很广，为酒曲菌种之一，能糖化淀粉并能生成少量酒精。可产生蛋白酶，有分解大豆蛋白的能力，我国多用制豆腐乳、豆豉。代表种有高大毛霉（*Mucor mucedo*）、总状毛霉（*Mucor racemosus*）。

(3) 曲霉

属于半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、丛梗孢科。种类繁多，分布极广，多数与粮食、饲料的霉变等方面有关。但曲霉在发酵工业、医药工业、食品工业等领域均起重要作用。曲霉的菌丝体是由具横隔的分枝菌丝构成，幼时无色，老熟后变为浅黄色至褐色。分生孢子梗顶端膨大特化成顶囊，顶囊表面生辐射状小梗，小梗单层或双层。小梗顶端生出分生孢子，串生。代表群：黑曲霉（*Aspergillus niger*）、黄曲霉（*Aspergillus flavus*）。

(4) 青霉

属于半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、丛梗孢科。种类繁多，分布极广。该菌在工业上有很高的经济价值，如青霉素的生产，干酪的加工，有机酸的制造等。但也有不少青霉菌是水果、食品、工业产品的有害菌。青霉菌的营养菌丝体无色、淡青色或具有鲜明的蓝绿青色。有横隔，菌落质地绒状、絮状等。分生孢子梗基部无足细胞，顶端不形成膨大的顶囊而是形成扫帚状的分枝。代表种有黄青霉（Penicillium chrysogenum）、橘青霉（Penicillium citrinum）。

第二节　微生物的生长与死亡

(一) 微生物的生长

微生物在适宜的环境条件下，不断地吸收营养物质，并按照自己的代谢方式进行代谢活动，当同化作用大于异化作用时，细胞质的量不断增加，体积增大，于是表现为生长。微生物在自然界中是混杂的生活在一起，哪怕是一粒细砂，其表面上生长着多种细菌及其他微生物。要想研究或利用某一种微生物，必须把这种微生物从混杂的微生物群中分离出来，然后使其繁衍后代，这个过程称为纯培养。微生物的纯培养是发酵工程的基本技术之一。

(二) 物理、化学因素对微生物生长和死亡的影响

生长是微生物与外界环境因素共同作用的结果。环境条件的改变，可引起微生物形态、生理、生长、繁殖等特征的改变；或者抵抗、适应环境条件的某些改变；当环境条件的变化超过一定极限，则导致微生物的死亡。为了抑制和消除微生物的有害作用，人们常采用多种物理、化学或生物学方法，来抑制或杀死微生物。常用以下术语来表示对微生物的杀灭程度。

(1) 灭菌　用物理或化学方法杀灭物体上所有的微生物（包括病原微生物和非病原微生物及细菌芽孢、霉菌孢子等），称为灭菌。

(2) 消毒　用物理或化学方法仅能杀灭物体上的病原微生物，而对非病原微生物及芽孢和孢子不一定完全杀死，称为消毒。用来

消毒的药物称为消毒剂。

（3）防腐　防止或抑制微生物生长和繁殖的方法称为防腐或抑菌。用于防腐的化学药品称为防腐剂。某些化学药物在低浓度时为防腐剂，在高浓度时则成为消毒剂。

（4）无菌　指没有活的微生物存在。采取防止或杜绝一切微生物进入动物机体或物体的方法，称为无菌法。以无菌法操作时称为无菌操作。在进行外科手术或微生物学实验时，要求严格的无菌操作，防止微生物的污染。

不同的微生物对各种理化因子的敏感性不同，同一因素不同剂量对微生物的效应也不同。在对微生物进行抑制或致死作用时，还应考虑多种因素的综合效应。例如在增高温度的同时加入另一种化学药剂，则可加速对微生物的破坏作用。常见的影响微生物生长与死亡的物理、化学因素如下。

1. 温度

温度是影响有机体生长与存活的最重要的因素之一。只有在一定范围内，机体的代谢活动与生长繁殖才随着温度的上升而增加，当温度上升到一定程度，开始对机体产生不利影响，如再继续升高，则细胞功能急剧下降以至死亡。微生物生长的温度范围较广，已知的微生物在－12～100℃均可生长。而每一种微生物都有其生长繁殖的最低温度、最适温度、最高温度和致死温度。最适生长温度对微生物迅速生长繁殖很重要，在此温度下，微生物群体生长繁殖速度最快，代时最短。不同微生物的最适生长温度是不一样的。最低和最高生长温度是指微生物存活的最低和最高温度界限。而致死温度是指致死微生物的最低温度界限，致死温度还与处理时间有关。微生物按其生长温度范围可分为低温微生物、中温微生物和高温微生物三类。

2. 氢离子浓度

环境中的酸碱度通常以氢离子浓度的负对数即 pH 值来表示。环境中的 pH 值对微生物的生命活动影响作用主要在于：通过引起细胞膜电荷的变化，影响微生物对营养物质的吸收；影响微生物体

内代谢过程中酶的活性；改变生长环境中营养物质的可给性以及有害物质的毒性。

每种微生物都有其最适 pH 值和一定的 pH 范围。在最适范围内酶活性最高，如果其他条件适合，微生物的生长速率也最高。实际上，微生物在基质中生长时，代谢产物可改变其氢离子浓度。随着环境 pH 值的不断变化，微生物生长受阻，当超过最低或最高 pH 值时，将引起微生物的死亡。为了维持微生物生长过程中 pH 值的稳定，配制培养基时要注意调节 pH 值，而且往往还要加入缓冲物以保证 pH 在微生物生长繁殖过程中的相对稳定。

强酸和强碱具有杀菌力。无机酸杀菌力虽强，但腐蚀性大。某些有机酸如苯甲酸可用作防腐剂。强碱可用作杀菌剂。

3. 氧化还原电位

氧化还原电位（Φ）对微生物生长有明显影响。环境中 Φ 值与氧分压有关，也受 pH 的影响。pH 值低时，氧化还原电位高；pH 值高时，氧化还原电位低。好氧微生物、厌氧微生物和兼性厌氧微生物生长所要求的 Φ 值不一样。

4. 辐射

辐射是指通过空气或外层空间以波动方式从一个地方传播或传递到另一个地方的能源。它们或是离子或是电磁波。一般波长愈长，所含能量愈低。

（1）紫外辐射　紫外线是非电离辐射，以波长 265～266nm 的杀菌力最强。紫外辐射能作用于微生物体内的核酸，引起核酸变化，从而破坏其蛋白质和酶的合成，导致细胞机能改变。紫外杀菌灯管在医疗卫生和无菌操作中广泛应用。紫外辐射的杀菌效果，因微生物生理状态、照射时间和剂量大小有关。

（2）电离辐射　X 射线与 α 射线、β 射线和 γ 射线均为电离辐射。在足够剂量时，对各种细菌均有致死作用。常用于一次性塑料制品的消毒，也用于食品的消毒。

5. 干燥

水分是微生物的正常生命活动必不可少的。干燥会导致细胞失

水而造成代谢停止以至死亡。日常生活中常用烘干、晒干和熏干等方法来保存食物。休眠孢子抗干燥能力很强，在干燥条件下可长期不死，这一特性已用于菌种保藏，如用砂土管来保藏有孢子的菌种。

6. 渗透压

适宜于微生物生长的渗透压范围较广，而且它们往往对渗透压有一定的适应能力。对一般微生物来说，高渗溶液中能造成细胞脱水而引起质壁分离，使细胞不能生长甚至死亡。相反，若将微生物置于低渗溶液或水中将引起细胞膨胀，甚至使细胞破裂死亡。由于一般微生物不能耐受高渗透压，所以日常生活中常用高浓度的盐或糖保存食物，如腌渍蔬菜、肉类及蜜饯等。

7. 超声波

超声波具有强烈的生物学作用。超声波的作用是使细胞破裂，所以几乎所有的微生物都能受其破坏，其效果与频率、处理时间、微生物种类、细胞大小、形状及数量等均有关系。

8. 重金属及其化合物

一些重金属离子是微生物细胞的组成成分，对微生物的生长促进作用是必需。大多数重金属及其化合物都是有效的杀菌剂或防腐剂，作用最强的是 Hg、Ag 和 Cu。如二氯化汞又名升汞，是杀菌力极强的消毒剂。0.1%～1%浓度的硝酸银常用于皮肤的消毒。

9. 有机化合物

对微生物具有有害效应的有机化合物种类很多，其中酚、醇、醛等能使蛋白质变性，是常用的杀菌剂。甲酚是酚的衍生物。杀菌力比酚强几倍，在皂液与碱性溶液中易形成乳液。市售的消毒剂煤酚皂液（来苏尔）就是甲酚与肥皂的混合液，常用 3%～5%的溶液来消毒皮肤、桌面及用具等。醇可使蛋白质脱水、变性，损害细胞膜而具杀菌能力。乙醇是普遍使用的消毒剂，70%的乙醇杀菌效果最好。甲醛也是一种常用的杀细菌与杀真菌剂，市售的福尔马林溶液就是 37%～40%的甲醛水溶液。

10. 卤族元素及其化合物

3%～7%碘溶于70%～83%的乙醇中配制成碘酊，是皮肤及小伤口有效的消毒剂。氯气或氯化物是一类最广泛应用的消毒剂。氯气一般用于饮水的消毒，次氯酸盐等常用作食品加工过程中的消毒。氯气和氯化物的杀菌机制在于：氯与水结合产生次氯酸(HClO)，次氯酸易分解产生新生态氧，这是一种强氧化剂，对微生物起破坏作用。

11. 表面活性剂

具有降低表面张力效应的物质称为表面活性剂，这类物质的加入可影响微生物细胞的生长与分裂，如肥皂、漂白粉、洗衣粉等。

12. 染料

染料，特别是碱性染料，在低浓度下可抑制细菌生长。由于这些染料具有选择性抑菌的特点，故常在培养基中加入低浓度的染料配制成选择培养基。

13. 化学疗剂

能直接干扰病原微生物的生长繁殖并可用于治疗感染性疾病的化学药物即为化学疗剂。它能选择性地作用于病原微生物新陈代谢的某个环节，使其生长受到抑制或致死。但对人体细胞毒性较小，故常用于口服或注射。

第三节　几类典型的微生物

一、能源性微生物

自然界里，在生物能的循环和流动过程中，一些异养型微生物作为生态系统中的物质循环的分解者，利用动植物残体等各种有机物，将其矿化分解最终使生物能以其最简单的无机物状态（甲烷、乙醇和氢气等）释放，这类微生物被称为能源性微生物。这种产能过程的重要意义在于使人类能够通过利用能源性微生物从而直接有效地使用生物能。

（一）能源性微生物的主要种类

根据安斯沃思（Ainsworth）的分类系统，运用世界上主要依

据的伯杰（Bergey）细菌鉴定法和洛德（Lodder）的酵母菌等鉴定法分类鉴定表明，能源性微生物的主要种类如下。

① 甲烷产生菌，主要种类有甲烷杆菌属、甲烷八叠菌属、甲烷球菌属等。

② 乙醇产生菌，主要种类有酵母菌属、裂殖酵母菌属、假丝酵母属、球拟酵母属、酒香酵母属、汉逊酵母属、克鲁弗酵母属、毕赤酵母属、隐球酵母属、德巴利酵母属、卵孢酵母属、曲霉属等。

③ 氢气产生菌，主要种类有红螺菌属、红假单胞菌属、红微菌属、荚硫菌属、硫螺菌属、闪囊菌属、网硫菌属、板硫菌属、外硫红螺菌属、梭杆菌属、埃希菌属、蓝藻类等。

（二）能源性微生物的能源产生机理

① 甲烷产生菌的作用机理是沼气发酵过程。该过程的第一阶段是复杂有机物如纤维素、蛋白质、脂肪等在微生物作用下降解至其基本结构单位物质的液化阶段，第二阶段是微生物将液化产物转化生成乙酸，第三阶段是甲烷产生菌将乙酸转化为甲烷。甲烷产生菌所产生的能源是当前已获大量实际应用的一种微生物能源。

② 乙醇产生菌的作用机理是酒精发酵作用，即把葡萄糖酵解生成乙醇。乙醇产生菌生产的能源性物质，目前主要用于燃料和替代汽车等运输工具所使用的汽车用油。

③ 氢气产生菌的作用机理主要是丁酸发酵作用。除此之外，氢气产生菌的其他分解有机物产生氢气的代谢机制目前尚未查清。氢气产生菌生产的能源物质氢气，目前主要是应用于燃料电池方面。由于许多自养性和异养性微生物产氢的机制和条件还在研究过程中，所以该类微生物能源的使用尚处于试验阶段。

当今，全世界能源供应趋于紧张，开发利用微生物能源，可以起到显著的缓解作用。工业利用能源而导致严重的环境污染更是日趋严重。利用微生物生产能源，不仅没有环境污染问题，而且可以治理污染，变废为宝，获得令人满意的综合效益。

二、极端环境微生物

极端微生物属于古细菌界，是一类很特殊的细菌，多生活在极端的生态环境中，如高、低温，高盐、高酸、高碱等环境，故因此得名。极端环境微生物具有原核生物的某些特征，如无核膜及内膜系统；也有真核生物的特征，如以甲硫氨酸起始蛋白质的合成、核糖体对氯霉素不敏感、RNA 聚合酶和真核细胞的相似、DNA 具有内含子并结合组蛋白；此外还具有既不同于原核细胞也不同于真核细胞的特征，如细胞膜中的脂类是不可皂化的，细胞壁不含肽聚糖，有的以蛋白质为主，有的含杂多糖，有的类似于肽聚糖，但都不含胞壁酸、D-型氨基酸和二氨基庚二酸。微生物对极端环境的适应，是自然选择的结果。了解极端环境下微生物的遗传生理特性，在理论上和实践上都具有重要的意义。

（一）极端嗜热菌（*themophiles*）

能生长在 90℃以上的高温环境。如科学家发现的古细菌，最适生长温度为 100℃，80℃以下即失活。德国的斯梯特（K. Stetter）研究组在意大利海底发现的一族古细菌，能生活在 110℃以上高温中，最适生长温度为 98℃，降至 84℃即停止生长；美国的 J. A. Baross 发现一些从火山口中分离出的细菌可以生活在 250℃的环境中。嗜热菌的营养范围很广，多为异养菌，其中许多能将硫氧化以取得能量。嗜热菌之所以耐热，主要是其结构机生理上具有一定的特点。近年来，对其嗜热机制有四种假说：类脂的敏感作用；重要代谢产物的迅速再合成；大分子的热稳定性；蛋白质合成系统的热稳定性。

（二）极端嗜盐菌（*extremehalophiles*）

生活在高盐度环境中，盐度可达 25%，如死海和盐湖中。常见的极端嗜盐菌有盐杆菌和盐球菌。盐杆菌属细菌特异的需要 Na^+，能在饱和盐水（盐度为 30%）中生长，而在盐度小于 15% 的水中不生长。这是因为嗜盐菌的细胞壁需要钠离子稳定，但细胞内的核糖体需要高浓度的 K^+ 维持稳定。目前关于嗜盐菌的嗜盐机制有三种解释：对高浓度的适应性；酶的嗜盐性；紫膜（嗜盐菌特

有的膜）的 H^+ 泵作用和排盐作用。

（三）极端嗜酸菌（*acidophiles*）

能生活在 pH 值 1 以下的环境中，往往也是嗜高温菌，生活在火山地区的酸性热水中，能氧化硫，硫酸作为代谢产物排出体外。

（四）极端嗜碱菌（*alkaliphiles*）

多数生活在盐碱湖或碱湖、碱池中，生活环境 pH 值可达 11.5 以上，最适 pH 值 8～10。

（五）产甲烷菌（*metnanogens*）

是严格厌氧的生物，能利用 CO_2 使 H_2 氧化，生成甲烷，同时释放能量。

由于古细菌所栖息的环境和地球发生的早期有相似之处，如高温、缺氧，而且由于古细菌在结构和代谢上的特殊性，它们可能代表最古老的细菌。它们保持了古老的形态，很早就和其他细菌分手了。所以人们提出将古细菌从原核生物中分出，成为与原核生物（即真细菌）、真核生物并列的一类。

三、非细胞型微生物——病毒（virus）

病毒不具有细胞形态，必须在电子显微镜下才可以观察到。人类和动物、植物的许多疾病都是由病毒引起的。病毒发现的比较晚，直到 1935 年美国生物学家斯坦来分离到烟草花叶病毒（tobacco mosaic virus）的结晶后，人类才开始对病毒进行有了真正的认识和了解。

（一）病毒的基本特征

病毒是一类非细胞型微生物。主要有下列基本特征：①个体微小，大多数病毒必须用电镜才能观察得到；②结构非常简单，遗传物质只是 DNA 或 RNA 中的一种类型核酸；③只能在寄主细胞（真核或原核细胞）内进行自我复制增殖；④对抗生素不敏感。

（二）病毒的形态与结构

1. 病毒的形态

病毒的个体非常微小，比较大型的病毒（如牛痘苗病毒）约

200～300nm，小型病毒（如脊髓灰质炎病毒）仅 20～30nm。病毒体主要有五种形态。

（1）球形　大多数人类和动物病毒为球形，如脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒及腺病毒等；

（2）丝形　多见于植物病毒，如烟草花叶病病毒等；

（3）弹形　形似子弹头，如狂犬病病毒等，其他多为植物病毒；

（4）砖形　如痘病毒（无花病毒、牛痘苗病毒等），其实大多数呈卵圆形或“菠萝形”；

（5）蝌蚪形　由一卵圆形的头及一条细长的尾组成，如噬菌体。

2. 病毒的结构与化学组成

（1）衣壳　病毒的衣壳是由许多衣壳粒按一定几何构型集结而成。每个衣壳粒是由 1～6 个同种多肽分子折叠缠绕而成的蛋白质亚单位。根据衣壳粒的排列方式，通常将病毒构形区分为：①立体对称（cubic symmetry），形成 20 个等边三角形的面，12 个顶和 30 条棱，具有五、三、二重轴旋转对称性，如腺病毒、脊髓灰质炎病毒等；②螺旋对称（helical symmetry），壳微粒沿螺旋形盘红色的核酸呈规则地重复排列，通过中心轴旋转对称，如正黏病毒，副黏病毒及弹状病毒等；③复合对称（complex symmetry），同时具有或不具有两种对称性的病毒，如痘病毒与噬菌体。

衣壳的功能除赋予病毒具有固有的形状外，还可保护病毒内部核酸免遭外界环境（如血流）中核酸酶的降解和破坏。衣壳蛋白质是病毒基因的表达产物，它具有病毒特异的抗原性，因此，可刺激机体产生抗原病毒的特异性免疫应答反应。病毒的衣壳与病毒的吸附作用有关，它具有辅助病毒感染作用。病毒表面特异性受体是病毒选择性吸附宿主细胞并建立感染灶的首要步骤。

（2）核酸　病毒的核酸包括双链 DNA（dsDNA）、单链 DNA（ssDNA）、双链 RNA（dsRNA）、单链 RNA（ssRNA）等不同类型；有的病毒不只有一个核酸分子，如流感病毒有 8 条 RNA，呼

肠孤病毒有 11～12 条 dsRNA。含 DNA 的病毒称为 DNA 病毒，含 RNA 病毒则称为 RNA 病毒。病毒 RNA 的碱基序列与 mRNA 完全相同者，称为正链 RNA 病毒；病毒 RNA 碱基序列与 mRNA 互补者，称为负链 RNA 病毒。根据核酸构形及极性可分为环状、线状、分节段以及正链、负链等不同类型。

病毒的核酸与衣壳组成核衣壳（nucleocapsid），最简单的病毒就是裸露的核衣壳，如脊髓灰质炎病毒等。有包膜的病毒核衣壳又称为核心（core）。

（3）病毒体其他结构　某些病毒，如流感病毒，在核衣壳外包绕着一层含脂蛋白的外膜，称为包膜（envelope）。包膜由脂质、多糖和蛋白质组成。其中蛋白质具有病毒特异性，常与多糖构成糖蛋白，嵌合在脂质层，表面呈棘状突起，称刺突（spike）。它们位于病毒体的表面，有高度的抗原性，并能选择性地与宿主细胞受体结合，促使病毒包膜与宿主细胞膜融合，感染性核衣壳进入胞内而导致感染。流感病毒的刺突由血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）组成，甲型流感病毒根据 HA 和 NA 抗原性不同，区分为若干亚型（H1～H15、N1～N9）。SARS 病毒包膜上有三种糖蛋白：S 蛋白、M 蛋白和红细胞凝集素酯酶。S 蛋白是主要的抗原，与受体结合，使细胞融合。M 蛋白是跨膜蛋白，参与包膜形成。

触须样纤维（fiber）：腺病毒是唯一具有触须样纤维的病毒，是由线状聚合多肽和球形末端蛋白所组成。该纤维吸附到敏感细胞上，抑制宿主细胞蛋白质代谢，与致病作用有关。此外，还可凝集某些动物红细胞。

（4）类病毒和援兵　近些年又发现另两类特殊结构的病毒，即类病毒和朊病毒。类病毒是没有蛋白质外壳的单链 RNA 分子。朊病毒是不含任何核酸的小分子无免疫原性的疏水蛋白质分子，能侵染动物并可在宿主细胞内增殖。

（三）病毒的复制

病毒以自我复制的方式进行增殖。当病毒进入寄主细胞后便发挥其生物活性。由于病毒自身缺少完整的酶系统，不具有合成自身

成分的能力，因此决定了它的专性寄生性，必须侵入易感的宿主细胞，依靠宿主细胞的酶系统、原料和能量复制病毒的核酸，借助宿主细胞的核糖体翻译病毒的蛋白质。病毒复制的基本过程分为吸附、穿入、脱壳、生物合成及装配释放五个步骤，但由于病毒种类繁多，核酸类别不同，因而病毒的复制机制不尽相同。

1. 双链 DNA 病毒的复制

腺病毒、疱疹病毒和乳多空病毒等都属于双链 DNA 病毒。有些病毒基因组的复制和衣壳的装配都在核内进行，病毒在胞浆内脱壳后，DNA 进入核内，在寄主细胞转录酶的作用下合成 mRNA，一部分基因组转录早期 mRNA，它们转译早期蛋白质，包括酶和 T 抗原等。T 抗原即肿瘤抗原，能促进细胞合成 DNA。有些病毒的基因组复制在核内进行，而衣壳的装配却在细胞浆内。病毒 DNA 的复制依赖于细胞的核酸聚合酶，由此产生的子代 DNA 用于转录晚期 mRNA，在胞浆内转译病毒的结构蛋白，并转移到细胞核内，供装配病毒粒子的衣壳。当然实际复制过程复杂得多，而且各病毒科间的差异很大。

2. 单链 RNA（ssRNA）病毒的复制

有些 ssRNA 病毒一旦进入寄主细胞就直接作为 mRNA，翻译出所编码的蛋白质，其中包括衣壳蛋白和病毒的 RNA 聚合酶。然后在病毒 RNA 聚合酶的作用下复制病毒 RNA，最后病毒 RNA 和衣壳蛋白自我装配成成熟的病毒颗粒。这类病毒很多，如 ssRNA 噬菌体、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、TMV 等。还有一类 ssRNA 病毒，它们的复制特点是 ssRNA 作为负链进入寄主后不能直接作为 mRNA，而是先以其为模板由转录酶转录出与负链 RNA 互补的 RNA，再以这个互补 RNA 作为 mRNA 翻译出遗传密码所决定的蛋白质。这类病毒称之为负链非侵染型病毒，如滤泡性口腔炎病毒、流感病毒、副流感病毒、莴苣坏死黄化病毒等。此外，还有一类特殊的 ssRNA 病毒即反转录病毒。该类病毒通常引起人和动物的肿瘤，其中包括造成人免疫性缺陷症的艾滋病病毒、白血病病毒、肉瘤病毒等。在它们的髓核中携带反转录酶，能使单链 RNA

反转录成双链 DNA，是随后这种 DNA 整合到细胞 DNA 中，长期持续下去并传给子代细胞，也可能转录 RNA，生产子代病毒或使细胞转化。这种病毒感染的细胞不会死亡，分裂不停止，也就是说这类病毒的潜伏期很长，有时可以终身带毒而不发病。

3. 双链 RNA 病毒的复制

双链 RNA 病毒基因组为 10～12 条双链 RNA 分子。病毒的 RNA-RNA 聚合酶能将病毒基因组转录成正链 RNA。也就是说，它们既能作为 mRNA，又能作为病毒基因组的模板。mRNA 翻译的结构蛋白装配内层衣壳后，正链 RNA 进入，并形成双链 RNA。然后又重复上述过程，最后获得了外层衣壳。

（四）病毒的遗传与变异

1. 突变

病毒的突变是指基因组中核酸碱基顺序上的化学变化，可以是一个核苷酸的改变，也可以是上百上千个核苷酸的缺失或易位。

2. 基因重组

当两种有亲缘关系的不同病毒感染同一宿主细胞时，它们的遗传物质发生交换，结果产生不同于亲代的可遗传的子代，称为基因重组。

（1）活病毒间的重组　例如流感病毒两个亚型之间可基因重组，产生新的杂交株，即具有一个亲代的血凝素和另一亲代的神经氨酸酶。这在探索自然病毒变异原理中具有重要意义。流感每隔十年左右引起一次世界性大流行，可能是由于人的流感病毒与某些动物（鸡、马、猪）的流感病毒间发生基因重组所致。

（2）灭活病毒间的重组　例如用紫外线灭活的两株同种病毒，若一同培养后，常可使灭活的病毒复活，产生出感染性病毒体，此称为多重复活，这是因为两种病毒核酸上受损害的基因部位不同，由于重组合相互弥补而得到复活。因此现今不用紫外线灭活病毒制造疫苗，以防病毒复活的危险。

（3）死活病毒间的重组　例如将能在鸡胚中生长良好的甲型流感病毒（A0 或 A1 亚型）疫苗株经紫外线灭活后，再加亚洲甲

型（A2 亚型）活流感病毒一同培养，产生出具有前者特点的 A2 亚型流感病毒，可供制作疫苗，此称为交叉复活。

3. 病毒变异的实际意义

① 研制减毒活疫苗。

② 应用于基因工程，也就是携带遗传信息的 DNA 片段，转移到另一个生物内，与原有生物体的 DNA 结合，实现遗传性状的转移和重新组合。目前病毒基因工程已在大肠杆菌、酵母菌中表达，用于制备疫苗。病毒作为基因工程载体也可以将所需要的外源基因带入人体或动物体内，以治疗人类遗传疾病或创造动物新品种。

（五）病毒与疾病

病毒虽然结构简单，但它却能很好地在各种生物体的细胞中生存、繁衍，同时也常常带来对生物体结构和机能的严重破坏。下面仅就几种常见的病毒致病机理加以介绍。

乙肝病毒（HBV）是 DNA 病毒，它只对肝脏“情有独钟”，在生物学上是嗜肝 DNA 病毒科（hepadnavividae）家族中的一员。输血或注射、破损的皮肤接触病毒污染物均可成为传染源。一个完整的乙肝病毒颗粒直径只有 42nm，大约是一个普通鸡蛋的百万分之一。乙肝病毒有外壳和核心两个部分。外壳厚 7～8nm，由脂质双层和蛋白质组成的囊膜。脂质双层内含有 S 抗原、前 S1 和前 S2 抗原，它们一起称为乙肝表面抗原（HbsAg）。剥去乙肝病毒颗粒的外壳，暴露出核心颗粒。核心颗粒直径 28nm，呈二十面体立体对称，它才是病毒真正的衣壳，由乙肝病毒的核心抗原（HBcAg）组成。通过强去垢剂或者酶处理的方法，还可以暴露出 HBV 的另一个主要的抗原 e 抗原，它的本质还不是十分清楚，但多数人认为是核心的断片。

乙肝病毒颗粒的中心部位就是环状并且有缺口的 DNA 双链，和依附在上面的 DNA 聚合酶。乙肝病毒的基因组最引人注目的一个特征就是它非常小，其 DNA 分子大约含有约 3200 个核苷酸，比已知的最大的病毒基因组小几百倍。而且乙肝病毒 DNA 的两链长短不一，长链完整，长度恒定，呈环状，称为负链。短链是正

链，长度可变，大概是长链的50%～80%，呈半环状。在感染肝细胞之后，这条半环状的DNA链就会以负链为模板，在催化剂——乙肝病毒DNA聚合酶的作用下延长，最终形成完整的环状。这时的乙肝病毒基因组就形成了一个完全环状的双股DNA。把这种DNA称做共价闭合环状DNA（即cccDNA），可以把它看作是病毒复制的原始模板。模板形成后，病毒基因会以其中的一条cccDNA为模板，利用肝细胞基因中的酶和DNA聚合酶的“催化”，一段基因又一段基因地复制，形成负链和正链。最后再装配到一起形成新的乙肝病毒DNA颗粒。这种cccDNA是乙肝病毒复制中重要的中间产物，一旦它在肝细胞核内形成，就具有了高度的稳定性，可长期存在于肝细胞内，不但起着刚才所说的“模板”作用，而且还像深深扎根在泥土里的野草一样很难完全清除。不论用什么抗病毒药物，不论细胞内的DNA受到多大的抑制，也不论用药的时间有多久，都很难清除这种cccDNA。只要肝细胞内有很少量的cccDNA，当停药后，核内的cccDNA又可以再次成为病毒复制的“模型”，继续复制乙肝病毒的DNA，这也是乙肝很难根治的原因。

其实乙肝病毒本身并不致病，它对肝细胞损伤主要是由机体的免疫系统清除反应引起的。乙肝病毒感染机体后，侵入到肝细胞内，致使肝细胞的某些结构发生变化。激发机体对自身的肝细胞产生免疫反应，便会引起会细胞损伤。在严重的肝损害病例中，机体免疫系统甚至将没有被HBV侵犯的肝细胞也一同杀死，这也说明自身免疫反应在乙肝炎的发病机制中有重要意义。免疫功能正常者，机体对感染HBV的肝细胞发生一系列的免疫反应，随着病毒被逐步消除，逐渐痊愈。这正是我国有45%以上的人曾经感染过乙肝病毒，但最终大部分人体内已经没有乙肝病毒残留的原因。机体清除乙肝病毒主要依赖T细胞（Tc，T杀伤细胞）或通过抗体介导的K细胞来杀伤靶细胞，将病毒释放于体液中，以后再经抗体作用。

下篇　生物工程技术

第五章　细胞工程

细胞工程是指以细胞为基本单位进行培养、增殖或按照人们的意愿改造细胞的某些生物学性状，从而实现创造新的生物和物种的工程技术手段，主要包括植物细胞工程和动物细胞工程两部分。

第一节　植物细胞工程技术

植物细胞工程技术主要是在植物细胞全能性理论基础上建立起来的。如第二章所述，细胞全能性是指细胞保留分化成有机体所有细胞类型的能力，即一个细胞中包含着这种生物的全部遗传信息（基因），在适当的条件下可以发育成一个完整的生物个体的能力。植物细胞工程不但指利用培养细胞再生成植株，同时也包含用培养细胞生产次生代谢物的技术。前者成为组织培养和转基因植物需要进行植株再生的理论基础，后者成为通过大规模培养植物细胞，生产人们所需要的次生代谢产物的技术基础，如通过红豆杉的细胞培养生产紫杉醇等。技术和理论是相辅相成的，技术手段的发明会促进理论的创新，理论的创新又会指导技术的实践活动。

早在 1902 年，哈伯兰特在其发表的著名论文《植物细胞离体培养实验》中，就提出植物细胞全能性是植物细胞工程的理论基础。他认为高等植物的器官和组织可以不断地分割，直至单个细胞，并预言植物体细胞在适宜的条件下，有发育成完整植株的潜力，提出了植物细胞全能性的设想。1958 年斯图尔德等人第一次

用胡萝卜根的韧皮部细胞证实了植物细胞的全能性。

进入20世纪60年代以后，植物细胞工程进入了迅速发展阶段，并逐步走向生产实践及应用，如快繁脱毒、单倍体育种、种质资源保存、生产次生代谢产物等，同时也为人工种子、细胞融合、转基因植物等技术的应用奠定了基础。

现在，我们已经可以利用细胞融合及DNA重组等现代生物技术从细胞和分子水平改良现有品种甚至于组建新品种。

一、植物组织培养

植物组织培养是指在无菌条件下，将离体的植物器官、组织、细胞或原生质体，培养在人工控制的环境里使其再生形成完整的植株。

植物组织培养中使用的外植体一般是已经高度分化了的细胞，只有脱分化之后，才可进行再分化。脱分化指已分化的组织在适当的培养条件下，恢复细胞分裂活性，从已分化的成熟状态转变为分生状态，也就是由有结构和功能的组织转化为无结构和特定功能的细胞团。愈伤组织即为典型的脱分化组织。这种转变在细胞的形态结构和生理生化上都会产生一系列变化。组织培养的研究结果表明分化细胞的脱分化需要两个条件，即经过创伤和外源激素的作用。

目前人们对于脱分化过程的本质还不十分清楚。分化细胞是在细胞周期中处于一种相对静止状态的细胞（G_0期细胞），脱分化就是要打破这种状态，使细胞进入细胞周期中的G_1期，开始进行细胞分裂，形成愈伤组织。

当细胞脱分化形成愈伤细胞后，经过一段时期的分裂，细胞群体又会产生分化，形成分生细胞或分生细胞团，由此再生成植株。脱分化的组织或细胞在一定条件下可转变为各种不同的细胞类型，表现为从无结构和特定功能的细胞团转变为有结构和特定功能的组织和器官，这一过程称为再分化。

有两条途径可以实现再分化：一是诱导出愈伤组织，将愈伤组织转接到继代培养基上，得到大量的愈伤组织，再接种到分化培养基上，形成幼苗后接种到生根培养基上，形成再生植株；二是愈伤

组织直接接种到分化培养基，在诱导出幼苗的同时，也诱导生根，成为完整的植株。

（一）培养基的制备

1. 培养基的组成与配制

植物组织培养的培养基大致由几种成分组成：①糖类；②多种无机盐类；③微量元素；④氨基酸、酰胺、维生素；⑤植物生长调节剂。此外，有些培养基还可添加酵母提取液、水解酪蛋白、麦芽浸出液等。根据培养目的不同，不同植物材料常需要改变配方，以满足需要，如维持生长与诱导细胞分裂和分化的培养基配方就不同。用于植物组织培养的培养基配方的种类很多，目前以 MS (murashige and skoog) 培养基配方为最常用的一种基本培养基，它利于一般植物组织和细胞的快速生长。根据培养方式不同，培养基主要分为以下两种。

① 固体培养基　将植物材料培养在加有琼脂等凝固剂的培养基中进行的培养。和液体培养基相比，此类培养基设备简单，培养时所占空间较小，但外植体基部容易出现气体交换不畅的现象，很难培养出均匀一致的细胞群体。

② 液体培养基　将植物组织块置于不加凝固剂的液体培养基中进行的培养。适合于大规模的工业化植物细胞培养。

在植物组织培养过程中，还需根据植物材料的种类和用途，在植物组织培养的培养基中添加一些生长调节剂，主要有吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)、腺嘌呤(6-BA、2ip)、激动素(KT)、玉米素(ZT)。

培养基中常用的大量元素包含 N、P、K、Ca、Mg、S 等六种盐类，可将其中的各种成分配成 10 倍、100 倍的母液，放入冰箱中保存，用时可按比例稀释。

B、Mn、Cu、Zn、Mo、Cl 等微量元素一般配成 100 倍甚至 1000 倍母液。配时也要注意顺次溶解后再混合，以免产生沉淀。

维生素和氨基酸类有机化合物，一定要分别配成单独的母液，用时根据所需浓度适当取用。

IAA、IBA、GA3、NAA、ZT 等植物激素，由于多数难溶于水，因此它们的配制方法特殊，一般先溶于少量 NaOH 或 95%酒精，再加水定容到一定浓度。

2. 培养基的除菌处理

植物组织培养中用到的各种培养基中含有丰富的营养成分，虽有利于培养物的生长，但也易使各种杂菌在上面迅速生长，所以植物组织培养过程中污染现象经常发生，使培养失败。培养基一旦被污染，迅速生长的各种杂菌不但会和培养物争夺营养，而且这些杂菌生长的过程中会生成大量对培养物有害的物质，导致培养物迅速死亡。因此，在进行培养前需要对培养基进行除菌处理。

培养基中的无机营养物、碳源等成分可以通过高压进行灭菌处理，一些易受高温破坏的培养基成分如 IAA、IBA、ZT 等，不宜用高温高压法消毒，可用过滤消毒。经过滤消毒后再加入已高温高压消毒的培养基中，过滤消毒应在无菌室或超净工件台上进行，以避免污染培养基。

造成培养基污染的因素有很多，一般包括：外植体带菌、培养瓶和各种器械灭菌不彻底、操作人员操作不规范等。所以在组织培养实验中用到的植物材料和各种器械都要进行彻底地灭菌，实验人员操作一定要规范，避免带入杂菌。

（二）植物材料的准备

1. 外植体的选择

用作培养的材料主要来源于植物的外植体，即在原生长部位取得并转移到培养基上生长的细胞或组织切块。植物的根、茎、叶、花、果实都可作为外植体。

植物组织培养成败的关键除了培养基的组分的正确选择外，另一个重要因素就是外植体本身的选择，即由活体植物上切取下来，用以进行离体培养的部分组织或器官的选择。进行外植体选择的具体原则如下。

① 从生长健壮的无病虫害的植株上选取发育正常的器官或组织作为外植体。选取外植体时应选择适当大小的、病毒含量低的、

易于消毒和灭菌的外植体，这样才能保证在组织培养中污染率低、脱毒率高、成活率高。不同植物各部位的分化再生能力不同，在外植体培养中也存在着各种差异性。各部位接种后的污染率也不同，各部位培养形成的再生植株的脱毒率也不同。对于大多数植物来说，茎尖是较好的外植体，由于茎形态已基本建成，病毒含量低或无病毒，生长速度快，遗传性稳定，所以是获取外植体的最佳部位。

② 不同季节取材的外植体，污染率也不同。春季取材与秋季取材差别不大，夏季污染率就高，明显高于冬季。因此，适当的时候取材会降低污染率。为了防止材料带菌，在采集外植体时，应注意以下几点：在生长健壮的无病虫害的植株上选取发育正常的组织或器官；将嫩梢采集回来，放在洁净的空气中水培抽芽，然后用这种新生组织培养，也可以避免污染；在晴天中午采集外植体；采集易于消毒和灭菌的组织部位进行培养，也可以降低污染率。

2. 外植体的消毒

外植体在接种之前，须经严格的灭菌消毒。对室外采集来的外植体，先用自来水冲洗干净，然后根据材料的不同，选用不同种类的灭菌剂，进行不同时间的表面灭菌。在选择消毒剂时，既要考虑具有良好的消毒、杀菌作用，同时又易被蒸馏水冲洗掉或能自行分解的物质，同时不会损伤或轻微损伤组织材料，从而不影响生长。植物种类不同，外植体不同，处理方法也不同。

为了使其消毒效果更为彻底，有时还需与粘着剂或润湿剂如吐温，以及抽气减压方法、磁力搅拌、超声振动等方法配合使用，使消毒剂能更好地渗入外植体内部，达到理想的消毒效果。

大量的试验结果证明，0.1%的升汞是最理想的杀菌剂。升汞对灭菌时间要求极为严格。时间过短，杀菌不彻底，时间过长，会对组织细胞有杀伤作用，不利于外植体诱导分化。因此需要根据不同的植物材料进行预试验，选择最佳的杀毒效果。在杀菌方式的比较试验中看出，不同的清洗方式对外植体的杀伤率和成活率影响极大，通过磁棒搅动冲洗能够加大对升汞残留的冲洗，减少对材料的

杀伤作用，降低褐化率，提高成功率。

如果在继代培养过程中发现污染，可以采用抗生素（如青霉素、氮苄青霉素等）和杀菌剂（如多菌灵、代森锌等）处理结合消毒，重新得到无菌苗。

外植体的幼嫩程度不同，其含菌量也不同，所需的灭菌条件也有差异。从酒精浓度、0.1%升汞灭菌时间两个方面进行试验，结果表明：幼嫩的外植体材料比老材料带菌量少，不仅所需0.1%的升汞的灭菌时间短，在7～9min之间能达到灭菌效果，而且酒精可用50%来代替70%，酒精浓度的降低，可以减少对材料的伤害，不降低其粘着效能，有利于升汞的杀菌作用，提高外植体的成活率。老的材料内生菌较多，皮部粗糙，所需0.1%升汞灭菌的时间就长(在9～12min之间)，且必须用70%的酒精，才能起到较好的灭菌效果。根据不同接种材料，采用不同的措施，就会减少不必要的失败，提高成功率。

（三）外植体的接种与培养

1. 接种与培养

首先将外植体分离出来，然后在无菌及适当条件下培养，诱导出愈伤组织或植株，诱导出得愈伤组织或植株随外植体生长一段时间后，还需要进行继代培养，以避免代谢产物积累及水分散失等因素的影响。

从组织或细胞再生完整植株可通过3条途径。

(1) 直接诱导腋生芽　从含腋芽的外植体上，可直接诱导出腋生芽。此途径可保持品种的原有特性，特别适合于苗木的快速繁殖。

(2) 直接诱导不定芽　从不含腋芽的器官诱导出芽。顶芽和腋芽以外任何其他器官或组织产生的芽统称为不定芽。出芽数量多，但有变异的可能。

(3) 诱导愈伤组织　从愈伤组织上诱导不定芽或胚状体。

愈伤组织再生植株的途径包括体细胞胚胎发生和器官发生。前者指离体培养的细胞在完成脱分化过程之后，在适当的诱导条件

下，能够通过胚胎发生过程产生体细胞胚或胚状体。后者指在一定的诱导条件下，离体细胞或组织重建芽的分生组织，分化出芽后再产生根，成为完整植株。

2. 培养条件

温度、湿度、光照等培养条件都能影响植物组织培养的效果，其中光照对于植物组织培养来说非常重要，影响的因素包括光照强度、光周期和波长。在愈伤组织的诱导阶段往往要暗培养，而在分化再生的过程中一定要有光照。愈伤组织诱导阶段的暗培养有利于细胞的脱分化产生愈伤组织，如果在光照条件下容易分化产生维管等组织，不利于产生大量的愈伤组织。在进行植物组织培养过程中，一定要调整光照的各种因素，以利于植物组织培养各个阶段的顺利进行。

（四）植物组织培养的类型及应用

1. 植物组织培养的类型

针对植物的培养主要有植物组织和器官培养、植物细胞培养、花药及花粉培养、离体胚培养以及原生质体培养等几个大类，每一种都还可以继续细分为更具体的小类。

① 植物细胞的培养可分为悬浮细胞培养、平板培养和饲养层培养等，它们都是将选定的植物细胞于适当的条件下进行培养，以得到大量基本同步化的细胞，为遗传操作提供材料或用来表达各种基因工程产物及次生代谢产物。

② 花粉及花药培养主要是使花粉或花药改变正常发育途径而转向形成胚状体和愈伤组织，从而产生单倍体植株。

③ 离体胚培养有幼胚与成熟胚培养两类，通过使用相应的培养基使离体胚正常的萌发生殖，以供研究和操作使用。

④ 原生质体的培养则是一切利用原生质体进行遗传操作的基础，它是将取得的植物细胞去除细胞壁形成原生质体后进行培养，具体方法与细胞培养有一定的相似之处。

2. 植物组织培养的应用

（1）人工种子　人工种子是指通过植物组织培养的方法获得的

能够正常发育的材料，其外面包被着由人工材料构成的种皮类外壳，在适宜的条件下可以发芽成苗的植物幼体。能够正常发育的材料通常是指胚状体，它可以由三种途径产生：

①由已脱分化的外植体直接产生；

②由愈伤组织产生；

③由悬浮细胞培养产生。

对胚状体的基本要求是：①播种后能快速出苗；②根和芽几乎同时生长，不产生愈伤组织；③同步化程度高；④活力强；⑤形成的幼苗的形态与生长要正常。

制作人工种皮的材料有海藻酸钠、明胶、树脂、琼脂糖、淀粉等。对人工种皮的要求是：①能保持胚状体的活力；②有利于储藏运输和萌发；③要有韧性，耐压，对胚状体无毒害；④含有胚状体发芽所需要的营养成分或植物激素；⑤还应含有杀菌剂，以防播种后微生物的侵害。

为了促进胚状体的生长发育，针对植物种类和土壤等条件，在人工种子的包裹剂中还可以加入适量的养分、无机盐、有机碳源以及农药、抗生素、有益菌等，还可以向人工种皮中加入一些植物生长调节剂。

人工种子的优点如下。

① 天然种子由于在遗传上具有因减数分裂引起的重组现象，因而会造成某些遗传性状的改变；天然种子在生产上受季节限制，一般每年只繁殖 1～2 次，有些甚至十几年才繁殖一次。而人工种子则可以完全保持优良品种的遗传特性，生产上也不受季节的限制。

② 相对于人工种子来说，试管苗的大量储藏和运输也是相当困难的。人工种子则克服了这些缺点，人工种子外层是起保护作用的薄膜，类似天然种子的种皮，因此，可以很方便地储藏和运输。

③ 在人工种子的制备过程中，针对植物种类和土壤等条件，在有的包裹剂中还可以加入适量的养分、无机盐、有机碳源以及农药、抗生素、有益菌等。为了促进胚状体的生长发育，还可以向人

工种皮中加入一些植物生长调节剂。因此，人工种皮是保证包裹在其中的胚状体顺利生长成小植株。

虽然如此，人工种子目前还存在不少问题。例如，现有重要经济价值的植物产生胚状体能力弱，难以形成同步化的有强活力的胚状体；成本较高；运输储藏以及机械化播种问题也未解决。因此，现在很少有人以生产为目的进行人工种子的研制。

(2) 植物的微型繁殖技术和工厂化育苗生产　“微型”繁殖是目前植物组织培养应用最多、最有效的方面。

植物“微型”繁殖技术具有高效性和可以保持种苗的优良遗传特性的优势。工厂化大规模育苗生产正是利用了植物“微型”繁殖技术的这两方面优势。利用植物“微型”繁殖技术我们可以在短时间中获得大量的优质种苗。“微型”技术可以使一些植物的扩增速度比常规方法快数万倍乃至百万倍，而且产生的幼苗遗传背景均一，重复性好，不受季节和地区限制。目前世界上已建成很多年产百万苗木的组培工厂，成为一种新兴产业。“微型”技术在观赏植物、园艺植物、经济林木和无性繁殖作物上已得到广泛应用。

生产上许多无性繁殖作物均受到病毒的侵染，从而导致品种的严重退化、减产和降低品质。利用植物分生组织进行培养可以使新长成的植株脱去病毒。利用这种方法生产无病毒苗的农作物有马铃薯、甘薯、大蒜、草莓、苹果、香蕉等，并已大规模应用于生产。

(3) 植物脱毒技术　对无性繁殖的植物来说，一旦感染上病毒之后，就会代代相传越趋严重。对于植物病毒没有特效药，目前较常用的防止方法有：①在田间早期拔掉病株，防止蔓延；②用杀虫剂消灭传播病毒的昆虫；③大多数植物病毒不侵入种子，可以用种子繁殖作物。

1952 年，法国科学家首次建立了植物茎尖培养脱病毒的方法，从而开创了防治植物病毒病的新途径。植物茎尖培养脱除病毒原理：

①茎顶组织细胞的分裂速度比病毒移动速度快；

②茎顶组织内部还没有形成维管束或者维管束还未发达，病毒

无法移动到茎顶部；

③培养基中高浓度激素抑制病毒增殖。

植物茎尖培养去病毒技术，实质上就是采取不含病毒颗粒或病毒颗粒含量甚少的 0.1～0.5mm 带 1～2 个叶原基的茎尖作为外植体，进行微繁殖，使其培养成完整的无病毒小植株的技术。由于所取的外植体很小，分离难度大，一般在解剖镜下操作。培养无病毒所用的器具必须严格消毒。

除了植物茎尖培养脱病毒的方法外，高温和低温处理脱毒技术、化学处理脱毒技术、愈伤组织培养脱毒法、花药培养脱毒法、柑橘珠心胚培养脱毒法和圆盘培养脱毒法等。

二、植物体细胞杂交

（一）植物体细胞杂交

植物体细胞杂交即原生质体融合，是克服植物有性杂交不亲和性、打破种间生殖隔离、扩大遗传重组范围的一种重要手段。其主要操作过程包括：原生质体制备、原生质体融合、杂种细胞筛选与培养、杂种植株再生与鉴定等步骤。下面以烟草与大豆的原生质体融合为例进行介绍。

1. 原生质体制备

选取烟草和大豆植株上的幼嫩叶片，用纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶将植物细胞壁分解掉，留下细胞膜包裹着细胞内含物——原生质体。烟草的原生质体呈绿色，大豆的无色，在显微镜下很容易将二者区别开来。

2. 原生质体融合

原生质体融合是指两个原生质体的质膜重新组合排列形成一个质膜，其中含有两个细胞核。诱导融合的手段有化学诱导和物理诱导。

物理和化学方法诱导原生质体融合的基本原理如下。

化学融合的机制：常用化学融合方法有高 pH-高 Ca^{2+} 法和聚乙二醇（PEG）法。高 pH-高 Ca^{2+} 法诱导原生质体融合的基本原理是利用高 pH-高 Ca^{2+} 中和原生质体表面所带的电荷，使原生质

体的质膜紧密接触，从而有利于质膜的接触融合。PEG 处理原生质体可以使原生质体聚集促进融合，但 PEG 诱导融合的真正机制目前并不清楚。

物理融合的机制：常用的物理融合方法为电融合法。此法是先将两种原生质体以适当的比例混合成悬浮液，将其滴入电融合槽中，给电融合槽两极以交变电流，使原生质体沿电场方向排列成串珠状，接着给以瞬间高强度的电脉冲，使原生质体膜产生局部破损而导致融合。

3. 杂种细胞的筛选和培养

当将融合后的细胞混合物移植到适当的培养基上进行培养时，生长出来的细胞是许多细胞的混合物，因此需要对这些细胞进行筛选。筛选方法有：①细胞系互补选择方法，包括叶绿素缺失互补、营养缺陷互补和抗性互补等；②物理特异性差异选择方法，利用两个原生质体物理特异性差异的一种选择，包括原生质体的大小、颜色、浮密度等的不同来选择；③生长特异性差异选择法，根据两种原生质体亲本的生长特异性进行选择。

例如当烟草与大豆的原生质体融合后，将原生质体转移到适当的培养基上培养，使原生质体再生出细胞壁。这时，在这些新长出来细胞中，不仅有烟草-大豆杂种细胞，还有烟草细胞、大豆细胞、烟草-烟草细胞、大豆-大豆细胞。根据两种亲本细胞在形态、色泽上的差异，将细胞分别接种在带有小格的培养皿中，每个小格中约放 1～3 个细胞。在显微镜下找出杂种细胞，并且标定位置。等杂种细胞分裂成细胞团时，转移到培养皿中，培养成愈伤组织。

4. 杂种植株的再生与鉴定

杂种细胞经再生，从愈伤组织培养出杂种植株，需要对植株进行再次鉴定。由于烟草和大豆分别属于茄科和豆科，二者的原生质体融合后，只能长成杂种愈伤组织，还不能分化，因此不能进行杂种植株的再生和鉴定。对于能够再生出杂种植株的，如白菜-甘蓝，长出的植株究竟是不是杂种，还需要经过鉴定才能确定下来。

杂种植株的鉴定方法有以下几种。①形态学鉴定：利用杂种植

株与双亲在表现型上的差异进行比较分析，如叶片大小与形状，花的形状与颜色、叶脉、叶柄、花梗及表皮毛有无等；②细胞学鉴定：理论上讲如果染色体不丢失，杂种细胞中染色体数目应为双亲染色体数目之和；③同功酶鉴定：同功酶是功能相同的酶的多重分子形态，它们是特异基因的产物，杂种细胞中的同功酶谱一般是双亲酶谱之和，但有时也会出现双亲没有的新带；④分子生物学鉴定：常用的方法有限制性片段长度多态性（RFLP）、随机扩增多态性（RAPD）和扩增片段长度多态性（AFLP）等。

（二）植物体细胞杂交技术的应用及存在的问题

在国家863计划支持下，我国植物细胞工程育种技术取得新突破，开辟了细胞工程育种与常规育种技术相结合的新途径，加快了育种进程。

1. 小麦及禾谷类体细胞杂交技术

获得作物的小片段易位系是植物育种学家们长期追求的目标，主要原因是小片段易位可在最大程度上排除不利基因的干扰，以插入方式存在有利于性状的稳定遗传，携带的目标基因易于定位和克隆，因而在作物的遗传育种及遗传理论研究中有巨大的价值。我国科研人员利用射线处理供体的不对称体细胞杂交方法，实现了异源染色体小片段向小麦的渐渗，从而建立了转移异源染色体小片段的技术，该技术为异源染色体小片段整合到受体染色体提供了直接而简便的方法，为向小麦及其他作物引入异源优异基因开辟了新途径。

2. 染色体工程和原生质体融合技术

通过秋水仙素处理伏令夏橙和金柑的胚性愈伤组织，再通过原生质体的分离和培养，得到了伏令夏橙的四倍体胚状体和金柑的四倍体、六倍体。胚乳平衡数（EBN）和染色体倍性操作技术拓宽了野生资源的利用，成功地转育了青枯病抗性、耐盐和耐低温糖化等优良基因到普通马铃薯栽培种中，并通过利用$2n$配子有性多倍化创造了优异四倍体杂种后代，为品种改良准备了材料和方法。

通过原生质体融合技术将野生茄子中的抗黄萎病基因转到普通茄子中，获得抗黄萎病和抗青枯病的育种材料。用 PEG 融合法将甘薯原生质体与其近缘野生种的叶柄（或叶片）原生质体进行融合，从种间体细胞杂种植株中筛选出具有良好结薯性的种间体细胞杂种，其育性正常，能同甘薯进一步成功杂交，这些体细胞杂种可望用于甘薯育种。

3. 马铃薯-番茄

1978 年，梅尔彻斯等利用体细胞杂交技术首次获得了马铃薯与番茄的属间体细胞杂种。他们将培育的二倍体马铃薯品系和番茄叶片细胞进行融合。像大多数杂种一样，杂交株同时具有马铃薯和番茄的形态特征，但是没有产生可结实的花、果实以及真正意义上的块茎。

杂交后代没有像人们预想的那样地上长番茄、地下结马铃薯，主要原因是：生物基因的表达不是孤立的，它们之间是相互调控、相互影响的，所以马铃薯-番茄杂交植株的细胞中虽然具备两个物种的遗传物质，但这些遗传物质的表达受到相互干扰，不能再像马铃薯或番茄植株中的遗传物质一样有序表达，杂交植株不能地上长番茄、地下结马铃薯。

值得注意的是，体细胞杂交尚存在以下一些问题：

① 亲缘关系越远，染色体排斥丢失的现象就越严重；

② 由于杂交后代染色体是两个物种的全部遗传物质的合并，各种基因都在其中，选择符合需要的个体难度大；

③ 有时缺乏选择杂种细胞的有效方法。

因此，目前对称融合的工作比较少，而是采用非对称融合，即一方亲本包括了全部遗传物质，另一方亲本只取一部分遗传物质，如用不具有核的原生质体与之进行融合。

三、植物细胞大规模培养

（一）植物细胞大规模培养与次生代谢产物生产

植物次生代谢产物是指植物中一大类并非植物生长发育所必需的小分子有机化和物，其产生和分布通常有种属、器官组织和生长发育

期的特异性。次生产物在植物中的合成与分解过程称为次生代谢。

目前，已知的植物次生产物已超过 2 万种。根据分子结构不同大致分为：酚类化合物——黄酮类、醌类、萜类化合物——三萜皂苷、甾体皂苷、单萜、倍半萜、二萜、生物碱与有机酸等。

1. 植物细胞大规模培养的技术要求

从工程的角度讲必须要进一步研究和开发适宜于植物细胞生长和生产的生物反应器，建立最佳的控制和调节系统；从培养技术方面讲必须满足以下三个条件：培养的细胞在遗传上应是稳定的，以得到产量恒定的产物；细胞生长及生物合成的速度快，在较短的时间内能得到较高产量的终产物；代谢产物要在细胞中积累而不被迅速分解，最好能将其释放到培养基中。

2. 植物细胞培养系统

(1) 悬浮培养系统　液体悬浮培养系统基本原理与上述实验室悬浮培养方法一致，但大规模培养所采用的设备及控制技术比实验室小规模培养要复杂得多。

① 机械搅拌式培养系统

机械搅拌式生物反应器通常是在微生物发酵罐的基础上改进设计的，根据植物细胞的特性，其设备要求在微生物发酵罐的基础上作如下改进：搅拌装置要减少剪切，一般改叶轮式为螺旋式；因为植物细胞生长周期长，需要随时补充水分和营养，因此必须设计加液装置；由于植物细胞的生理活动需要新鲜空气，且细胞代谢也可能产生有害气体，所以必须设计通气装置；为便于取样观察，一般还设计有取样口。

② 气压搅拌式培养系统

由于到机械搅拌式反应器的剪切作用难以避免，同时搅拌器转动的中轴往往是容易使培养物污染的部位，因此，又开发出空气提升式生物反应器，但其缺点是搅拌不均匀。

③ 旋转式培养系统

一般用于产品中试或某些必须裂解细胞才能获得目的产物的培养，其优点是控制精确，处理灵活，缺点是培养体积较小。

(2) 固定化培养系统　定化培养系统的优点在于：可以较容易地控制培养系统的理化环境，从而可以研究特定的代谢途径，并便于调节；细胞位置的固定使其所处的环境类似于在植物体中所处的状态，相互间接触密切，可以形成一定的理化梯度，有利于次生产物的合成；由于细胞固定在支持物上，培养基可以不断更换，可以从培养基中提取产物，免除了培养基中因含有过多的初生产物对细胞代谢的反馈抑制；也由于细胞留在反应器中，新的培养基可以再次利用这些细胞生产初生产物，从而节省了生产细胞所付出的时间和费用。

正是由于细胞固定在一定的介质中，并可以从培养基中不断提取产物，因此，它可以进行连续生产。细胞固定化培养技术按照其支持物不同可以分为两大类：

① 包埋式固定化培养系统，支持物多采用琼脂、琼脂糖、藻酸盐、聚丙烯酰胺等；

② 附着式固定化培养系统，支持物采用尼龙网、聚氨酯泡沫、中空纤维等材料。

3. 植物细胞大规模培养技术要点

① 细胞系的建立和选择；

② 优良细胞系的增殖培养；

③ 大规模培养体系的建立。

培养方式有：间歇培养（包括流加间歇培养，两级或多级间歇培养）；连续培养（单级连续培养，多级连续培养）；回流式连续培养和固定化细胞培养四种方式。

4. 植物次生代谢产物在医药等领域的重要意义

① 规模化细胞培养是生产植物次生产物的理想途径　现在临床上应用的许多药物，例如治疗疟疾的奎宁、青蒿素，治疗高血压的利血平，治疗恶性肿瘤的长春碱、紫杉醇等药物都是从植物提取。人工培养的植物细胞具有跟完整植株同样的或接近的代谢功能。因此，可以利用植物细胞来生产各种有用的天然物质，进而再提取出来为我们所用。近些年来，有些人不顾一切地乱采乱摘中

药，使天然的野生的重要资源极度匮乏。例如，大家都知道，杜仲是一种非常好的滋补强壮剂，有些人就常常去剥杜仲树的皮，这就意味着总有一天会把野生的药用植物采光。现在已有上百种药用植物紧缺或处于濒危状态。因此，可以利用植物细胞大量培养技术，通过不断改变细胞的培养条件和筛选有用物质含量高的细胞进行培养，可以提高有用物质的含量，解决资源紧缺的问题。

② 保护生态环境，发展新型生物技术产业。

（二）藻类的培养

藻类全身具营养价值，如螺旋藻含有β-胡萝卜素、γ-亚油酸、多种氨基酸等多种有益的物质。单细胞藻类的大规模培养具有高产、节能、生产周期短、开发海洋资源、操作过程简易等优点。

单细胞藻类的培养方式有多种多样，可以根据不同的培养目的和不同的培养条件来选择不同的方法。只要是能够充分满足单胞藻的生长条件，在培养期间没有污染，便于操作，能达到培养目的。

1. 培养方法

常用的培养方法从不同的角度可以大概地进行以下分类。

（1）纯培养和单种培养　纯培养即无菌培养，是没有任何其他一切生物的单种培养。单种培养是不排除细菌存在条件下的单一藻种的培养。

（2）充气培养和不充气培养　充气培养一般是在高密度培养时采用，用充气的方式补充培养液中的二氧化碳。

（3）开放式培养和封闭式培养　开放式培养的容器是敞开的，由于有充足的光照和空气流通，一般来说藻类的生长比较快，但是容易被污染。封闭式培养是将藻类培养在封闭的玻璃瓶、透明圆柱形容器、透明塑料薄膜袋等容器中，容器除了充气管、加液管和藻液抽出管外，不与外界接触。封闭式培养由于污染少，培养的成功率很高。

（4）一次性培养和连续培养　一次性培养是指培养液中的藻类长起来后一次性采收。如果当藻类达到一定的密度时只采收了一部分藻液，又加入新的培养液继续培养，成为半连续培养。连续培养一般为室内的封闭培养，有人工光源，充气，培养的藻类在优化的

条件下快速生长繁殖，培养液从一端连续流入，一定密度的藻液则从另一端连续流出。连续培养的流量是可以人为控制的。

2. 培养单胞藻的日常管理

（1）搅拌和充气　通过搅拌和充气使空气中的二氧化碳溶解到培养液中，促进藻类细胞的光合作用，另外可以帮助沉底的细胞上浮获得光照。在培养中可以根据具体情况分别采用摇动、搅拌或充气的方法。

（2）调节光照　光强和光周期对藻类生长的影响非常大，培养时必须根据培养种类对光照的要求采取挡光、遮光或增加人工光照等措施使培养物得到适合的光照。

（3）每一种藻类都有最适的温度范围，为了保证培养藻的快速生长，必须为其提供适宜的温度。如是室外的大面积培养，当季节变化，气温不适合原来培养的藻类时，必须更换其他适当的种类。

（4）pH 值的变化　随着藻类细胞对营养盐的不平衡吸收，培养液的 pH 值会发生变化，有时这种变化会在短时间内发生。当培养液的 pH 值超出藻类的最适范围时，就会抑制藻类的生长。因此，在日常管理中要格外关注培养液 pH 值的变化。可以用 1 当量浓度的盐酸溶液或氢氧化钠溶液来调节培养液的 pH 值。

第二节　动物细胞工程技术

动物细胞工程是一种根据细胞生物学及工程学原理定向改造动物细胞遗传性状，创造具有新的遗传性状的物种，或通过工程化技术手段生产名贵药物及服务的技术。其内容包括：人工受精、胚胎移植、体外受精、细胞融合、染色体及染色体组改造及转移、单克隆抗体、动物细胞大规模培养及动物细胞反应器等方面。

一、动物细胞培养技术

（一）动物细胞培养有关术语

首次从组织分离出来的细胞培养称为原代培养。原代培养物经传代成功后即成细胞系。如果细胞系不能继续传代或传代数有限，

称为有限细胞系，如可以继续传代，则称为连续细胞系。通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志的培养物称为细胞株。

（二）动物细胞培养的条件

动物细胞的体外培养就是模拟动物体内的特定生理条件，使动物细胞在体外生长繁殖和发育的过程。因此在动物细胞培养过程中必须对动物细胞生长繁殖的各种因素加以人工控制，使之符合动物细胞生长发育的需要，这些外部条件主要有以下几个方面。

（1）温度　温度是动物细胞生长繁殖所必需的条件，大多数动物细胞培养最适的温度是37℃，昆虫细胞培养所需的温度为27℃。

（2）二氧化碳　在动物细胞培养过程中，需要提供恒定的二氧化碳浓度，以此来维持动物细胞生存所需的氧气的浓度，使空气中氧饱和值在60%以下，并维持动物培养基的pH在7.1～7.4之间。

（3）无菌条件　无菌条件对动物细胞的培养至关重要。各种实验材料、器具、培养基等都须经过无菌化处理，所有的操作都需要在无菌的条件下进行。

（4）双蒸水　动物细胞培养对各种微量元素的存在非常敏感，由于普通水中含有许多金属离子，某些金属离子或微量元素可能对动物细胞的生长有一定的毒害作用，因此动物细胞培养用的水需经过两次蒸馏才能满足要求。

（三）动物细胞培养

1. 动物细胞培养基

培养基是维持细胞生存、生长和繁殖所必需的营养物质，根据使用目的不同，分为生长液和维持液。和植物细胞相比较，动物细胞对培养基的要求比较高，而且不同来源的细胞对培养基的要求也不同，差异较大。动物细胞培养基的主要组成成分有氨基酸、蛋白质、核酸类物质、葡萄糖、维生素、抗生素、生长因子、微量元素及缓冲系统。维持液含低浓度或不含小牛血清，血清中含有蛋白质、氨基酸、葡萄糖、激素等，其中蛋白质主要为白蛋白和球蛋白。构成动物培养基的氨基酸有多种，是细胞合成蛋白质的基本成

分，其中有些氨基酸动物细胞本身不能合成，必须由培养液提供。由于血清含有胰岛素、生长激素以及多种生长因子、多种未知的促细胞生长因子、促贴附因子及其他活性物质，能促进细胞的生长、增殖和贴附。因此，细胞培养时，要保证细胞能够顺利生长和增殖，一般需添加 10%～20%的血清。

无血清培养基是在合成培养基的基础上，引入成分完全确知或部分明确的血清替代成分，使培养基既满足细胞培养要求，又有效避免因使用血清而带来的问题，已被广泛应用于研究和生产中，特别是细胞工程生物制药中。

2. 动物细胞培养方法

(1) 细胞的制备　细胞从组织中游离出来可以采用酶消化法(胰蛋白酶等)、物理分散法（加压过筛）或两种方法相结合。用酶消化的是细胞间基质，细胞间基质主要成分有胶原蛋白、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、弹性蛋白等成分。用蛋白酶可使其消化，从而使细胞相互分离。

(2) 细胞培养

① 细胞原代培养：

把样品组织剪成 1～2mm 3 小块，用无血清培养液冲洗 2～3 次。将组织块移入小瓶中，加混合消化液，在 37℃下消化 40min。消化液过 100 目筛网，收集滤液，移入离心管。800r/min 离心 5min，吸弃上清液。用无血清培养液离心洗涤 1 次。用培养液（含 10%胎牛血清）重新悬浮细胞，计数。将细胞接种于培养瓶中，密度为 106 个/mL，在 37℃、5%CO_2 条件下培养。

② 细胞传代培养：

取对数生长期的培养细胞，弃去培养液；加 1mL0.25%胰蛋白酶消化液漂洗 1 次，弃去消化液；再加 1mL 消化液漂洗 1 次，弃去大部分消化液，室温放置 2～5min；镜下看到细胞收缩变圆，加 1～2mL 含血清培养液，用吸管轻轻吹打，使细胞从培养瓶壁上脱落。取样，计数，调整细胞浓度；按 104 个/mL 接种到新的培养瓶中，在 37℃、5%CO_2 下培养。

(3) 培养方式　不同的培养方式适合于不同组织来源的细胞。

① 悬浮培养：主要用于血液、淋巴细胞、肿瘤细胞，包括杂交瘤细胞和一些转化细胞的培养，这类细胞无需贴附到固体介质上就能生存和生长，称为非贴壁依赖性细胞。

② 贴壁培养：大多数动物细胞，包括非淋巴组织的细胞和许多异倍体体系细胞，多采用贴附着于固体表面进行培养，这类需贴附到固体介质上才能生存和生长的细胞称为贴壁依赖性细胞。

(四) 动物细胞的冷冻与复苏

1. 动物细胞的保存

用于动物细胞培养的培养基价格非常昂贵，动物细胞如果长期不使用，可以将细胞在液氮中进行长期保存。由于直接冻存细胞，细胞内和外环境中的水都会形成冰晶，能导致细胞内发生机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、pH 改变、蛋白变性等，从而引起细胞死亡。因此，在冻存细胞之前，需要向培养液加入保护剂，可使冰点降低。在缓慢的冻结条件下，能使细胞内水分在冻结前透出细胞。储存在－130℃以下的低温中能减少冰晶的形成。

目前常用的保护剂为二甲亚砜（DMSO）和甘油，它们对细胞无毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞。

① 冻存时，一般要求活细胞在 95%以上。细胞活力差，在冻存后的成活机率很小。因此，一定要在细胞旺盛分裂时期进行冻存处理。

② 冻存细胞时量要多，一般 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL，冻存液比例培养基 7∶血清 2∶DMSO1，也有将血清比例加大的做法，有的甚至将血清提高到 90%，具体浓度视经验而定。

③ 混合 DMSO 要快，因为 DMSO 对细胞有毒性，混合之后应尽快冻存。

④ 冻存遵循缓冻速融原则，冻存步骤为－4℃ 30min ⟶ －20℃1～2h ⟶ －80℃过夜⟶沉入液氮。也可以用棉花或泡沫塑料封好后直接－80℃过夜，然后沉入液氮。

2. 细胞的复苏

冻存的动物细胞复苏是一个与冻存细胞相反的过程。细胞复苏时速度要快，使之迅速通过细胞最易受损的－5～0℃，细胞仍能生长，活力受损不大。

将冻存细胞取出，快速放入 37 度水浴中待细胞融化后立即取出，在超净台上转至细胞瓶中，然后缓慢加入培养基，边加边摇动细胞瓶，最后加 20%血清。复苏后 1～2 小时，待细胞贴壁后，缓慢将培养液倒出，加入新鲜培养基，血清（15%），培养 3 天观察。

二、动物细胞融合与单克隆抗体技术

（一）动物细胞融合技术

动物细胞融合是指在外界条件的作用下，将两种或两种以上异源动物的细胞合并为一个多核细胞的过程。融合的方法主要有由病毒和 PEG 介导的融合及电场介导的融合。在融合过程中，影响细胞融合的因素主要有细胞表面性质、温度、最适 pH 值、离子强度等。

动物细胞融合发生以后，需要对杂种细胞进行筛选。杂种细胞筛选原理是将融合混合物接种于选择性培养基上，以终止同型多核、异型多核及未融合亲本细胞的繁殖过程。主要的筛选系统有 HAT 选择，耐药性筛选，营养互补选择，原位杂交及基因探针选择等多种方法，可以根据所用细胞的特性、实验室条件加以选择。

细胞融合技术主要应用在：染色体的基因定位；遗传疾病的治疗与基因互补分析；特殊活性物质的制备等方面。

（二）单克隆抗体技术

1. 基本概念

（1）抗原决定簇　对于一个免疫刺激，每一个淋巴细胞都会合成并分泌一种单个的抗体，这些抗体可以高度特异地识别免疫抗原的特定区域，也就是抗原决定簇。

（2）多克隆抗体　由于一个抗原通常都有几个不同的抗原决定簇，因此每个免疫淋巴细胞都可能产生一种针对某一个抗原决定簇的抗体，这些由同一抗原而产生的不同的抗体统称为多克隆抗体。由于一种抗原往往具有多种不同的决定簇，而每一种抗原决定簇又可以被许多种不同的抗体所识别，因此事实上每一种抗原都拥有大

量的特异性的识别抗体。

（3）单克隆抗体　每个B淋巴细胞仅专一地产生、分泌一种针对某种抗原决定簇的特异性抗体，这种抗体叫单克隆抗体。

2. 单克隆抗体技术路线

B淋巴细胞具有专一地产生、分泌一种针对某种抗原决定簇的特异性抗体，却不能在培养液中生长繁殖的特性。而从B细胞转变而来肿瘤细胞（骨髓瘤细胞）可以无限增殖，二者具有相容性。因此可以通过细胞融合技术制备杂交瘤细胞，使其具有两种细胞的特点，既可以在体外进行传代培养，又可以分泌大量单克隆抗体。从而成功地解决了从一个淋巴细胞制备大量单克隆抗体的技术难题。这项技术就是淋巴细胞杂交瘤技术。

单克隆抗体具有专一性强、质地均一、反应灵敏等特点，在理论研究和实验应用方面都具有十分重要的意义。

单克隆抗体制备的步骤包括：免疫动物、淋巴细胞培养与融合、杂交瘤细胞系克隆和杂交瘤细胞的筛选以及杂交瘤细胞株保存和复苏等。下面以小鼠制备单克隆抗体为例进行说明。

（1）动物免疫　选用6～10周龄，健康、发育良好的雌性BALb/c小鼠进行免疫。根据病原体的抗原性、免疫原性和小鼠免疫反应性决定免疫途径，免疫次数，间隔时间和持续时间。间隔2～3周重复注射1～2次，融合前3天用同样剂量腹腔或静脉注射加强免疫一次。杂交瘤技术常用的瘤细胞来自于BALb/c小鼠。

（2）淋巴细胞培养与融合　因为在体外细胞培养中，单个或少数淋巴细胞不易生长与增殖，需加入其他饲养细胞共同培养，才可能使之生存。常用的饲养细胞有小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞、胸腺细胞或大鼠胚胎传代纤维母细胞等。取免疫过的小鼠脾脏，制备脾细胞悬液，用完全培养液悬浮细胞，加入饲养细胞，在5%CO_2，37℃条件下培养5天后，收获细胞供融合用。

免疫亲代脾细胞与骨髓瘤细胞在融合剂作用下，膜先行融合形成双核细胞或混核体。细胞融合的方法有物理方法、化学方法等。目前用于细胞融合的诱导剂是聚乙二醇（PEG）。

将准备好的骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按1∶5～1∶10比例混合，加入20～50mLRPMI-1640液，1000r/min离心10min，弃上清，用手指轻轻击打离心管底部，使沉淀细胞分散，将离心管置37℃水浴中，吸取1mL37℃预温的50%PEG缓缓滴入离心管内，1min内加完。37℃静置1min，滴加完全培养液（37℃预温）1mL，1min内加完，再加RPMI-1640液到50mL使PEG作用终止。800r/min离心10min，弃上清，将沉淀细胞轻轻悬浮于所需容积的HAT培养液中，接种24孔或96孔培养板置37℃5%CO_2温箱中培养。

（3）杂交瘤细胞的筛选　经PEG处理后的两种亲本细胞，可形成多种细胞成分的混合体，包括未融合的游离亲本细胞、骨髓瘤细胞间的融合、免疫B细胞间的融合及骨髓瘤细胞与免疫B细胞间的融合的异核细胞，仅后者可形成杂交瘤。

为了将杂交瘤细胞从其他混合细胞中筛选分离出来，通常用含有次黄嘌呤(hypoxanthine，H)、氨基喋呤(aminoptenn，A)和胸腺嘧啶核苷(thymidine，T)的HAT培养基进行筛选。融合后每3～5天换一次HAT培养液，每次1/2换入新液，连续2周。3～5天后未融合及自身融合的细胞逐渐死亡，1周左右可出现克隆，并不断增殖。当细胞布满培养板的底部1/2时即可取上清作抗体活性检测、筛选。

（4）杂交瘤细胞的克隆化培养　以上所获得的杂交瘤细胞在HAT培养液中生长形成克隆后，其中仅少数是分泌预定特异性McAb的细胞，大多数培养孔中有多个克隆生长，分泌的抗体也可能不同，因此，必须应用酶联免疫吸附等试验进行筛选和克隆化。常用的克隆方法有有限稀释法、直接挑取法、软琼脂法等。

将杂交瘤细胞稀释，用多孔细胞培养板培养，使每孔细胞不超过一个，通过培养让其增殖。然后检测各孔上清液中细胞分泌的抗体（常用酶联免疫吸附试验法），那些上清液可与特定抗原结合的培养孔为阳性孔。阳性孔中的细胞还不能保证是来自单个细胞，挑选阳性孔的细胞继续进行有限稀释，一般需进行3～4次，直至确信每个孔中增殖的细胞为单克隆细胞。该过程即为杂交瘤细胞的克

隆化培养。

（5）McAb 的制备　单克隆抗体的制备方法有以下几种。

在小鼠体内接种筛选出的杂交瘤细胞，采取体内诱生法，制备腹水或血清。选择适当的健康小鼠，先于小鼠腹腔注射 0.3mL 降植烷（prisame）或石蜡油，7～10 天后于每只小鼠腹腔注射阳性克隆的杂交瘤细胞（0.5～5）$\times 10^8$ 个。待小鼠腹部明显膨大到一定程度时，用 9 号针头抽取腹水或用 16 号针头放腹水，可反复收集数次。腹水经离心后，取上清分装，置－20℃保存备用。

也可将对数生长期的杂交细胞于小鼠背部皮下多点注射，待肿瘤达到一定大小后（10～20 天）即可采血，血清中 McAb 的含量可达 1～10mg/mL。

近年来发展了各种新型培养技术和装置进行的体外杂交瘤细胞培养法，包括用无血清培养液作悬浮培养法、中空纤维培养系统、全自动气升式或微囊、粒珠培养系统等，用来大量生产单克隆抗体。

（6）杂交瘤细胞株的冷冻和复苏　克隆化和经鉴定的杂交瘤细胞株，或是一时来不及克隆化鉴定的杂交瘤细胞，和其他动物细胞一样，可以在－196℃液氮保存，以保持其特性和活性。需要的时候再进行复苏。

（7）单克隆抗体的应用　诊断治疗病毒性疾病，用单克隆抗体可以检测出多种病毒中非常细微的株间差异，鉴定细菌的种型和亚种。诊断异常准确，误诊率大大降低。“生物导弹”——单克隆抗体作载体携带药物，使药物准确地到达癌细胞，以避免化疗或放射疗法把正常细胞与癌细胞一同杀死的副作用。

能精确地检测排卵期，新一代免疫避孕药，用精子、卵透明带或早期胚胎来制备单克隆抗体，将它们注入妇女体内，人体就会产生对精子的免疫反应，从而起到避孕作用。

三、动物克隆

（一）克隆的定义

克隆通常被定义为无性繁殖系，即同一克隆内所有成员的遗传构成是完全相同的。

克隆现象在自然界植物、动物和微生物中早已存在，例如同卵双胞胎实际上就是一种克隆。然而，天然的哺乳动物克隆的发生率极低，且大多数是随机发生的，缺乏目的性，所以很少能够被用来为人类造福。随着生物技术的迅猛发展，人们开展了用人工的方法进行高等动物克隆的研究工作。

目前，进行哺乳动物克隆的方法主要有胚胎分割和细胞核移植两种。克隆羊“多莉”，以及其后各国科学家培育的各种克隆动物，采用的都是细胞核移植技术。

所谓细胞核移植，是指将不同发育时期的胚胎或成体动物的细胞核，经显微操作移植到去核卵母细胞中，重新组成胚胎并使之发育成熟的过程。与胚胎分割技术不同，细胞核移植技术，特别是细胞核连续移植技术可以产生无限个遗传相同的个体。由于细胞核移植是产生克隆动物的有效方法，故人们往往把它称为动物克隆技术。根据核供体的来源不同，可将其分为胚胎细胞克隆和体细胞克隆两种。

（二）动物克隆的历史

1938 年汉斯·施佩曼提出采用细胞核移植技术克隆动物的设想，采用从发育到后期的胚胎（成熟或未成熟的胚胎均可）中取出细胞核，将其移植到一个卵子中，来完成动物克隆。这一设想是现在克隆动物的基本途径。

从 1952 年起，科学家们首先采用青蛙开展细胞核移植克隆实验，先后获得了蝌蚪和成体蛙。1963 年，我国童第周教授领导的科研小组，首先以金鱼等为材料，研究了鱼类胚胎细胞核移植技术，获得成功。

哺乳动物胚胎细胞核移植研究的最初成果是在 1981 年取得的。卡尔·伊尔门泽和彼得·霍佩用鼠胚胎细胞培育出发育正常的小鼠。1984 年，施特恩·维拉德森用取自羊的未成熟胚胎细胞克隆出一只活产羊，其他人后来利用牛、猪、山羊、兔和猕猴等各种动物对他采用的实验方法进行了重复实验。1989 年，维拉德森获得连续移核二代的克隆牛。1994 年，尼尔·菲尔斯特用发育到至少

有120个细胞的晚期胚胎克隆牛。到1995年，在主要的哺乳动物中，胚胎细胞核移植都获得成功，包括冷冻和体外生产的胚胎；对胚胎干细胞或成体干细胞的核移植实验，也都做了尝试。但成体动物已分化细胞核移植一直未能取得成功，直到克隆羊“多莉”的诞生，才实现了哺乳动物的体细胞克隆。

（三）动物克隆的技术路线

动物克隆的技术路线包括去核卵的制备、供体细胞的分离及细胞核移植三个主要步骤。以克隆羊“多莉”为例，整个克隆过程如下：

首先，从一只产自芬兰的6岁成年母绵羊A的乳腺中取出一个本身并没有繁殖能力的普通细胞，将这个细胞核内的染色体分离出来备用。然后，取出另一只母绵羊B的未受精的卵细胞，将这个卵细胞中的细胞核内的染色体取出，换上母绵羊A的乳腺细胞的染色体，形成一个含有新遗传物质的卵细胞，再将这个卵细胞用物理的方法激活，促使它分裂发育成胚胎。最后，当胚胎生长到一定程度时，将它植入第三只母绵羊-代孕母亲C的子宫中，经过正常的妊娠产下“多莉”。

“多莉”完全继承了其亲生母亲——母绵羊A的全部DNA基因特征，是母绵羊A百分之百的“复制品”。

体细胞克隆的成功为转基因动物生产掀起一场新的革命，动物体细胞克隆技术为迅速放大转基因动物所产生的种质创新效果提供了技术可能。采用简便的体细胞转染等技术实施目标基因的转移，可以避免家畜生殖细胞来源困难和低效率等不利因素。

（四）动物克隆技术的应用前景

到目前为止，动物克隆技术已经展示出了广阔的应用前景，概括起来大致有以下四个方面：①培育优良畜种和生产实验动物；②生产转基因动物；③生产人胚胎干细胞用于细胞和组织替代疗法；④复制濒危的动物物种，保存和传播动物物种资源。

转基因动物研究是动物生物工程领域中最诱人和最有发展前景的课题之一，转基因动物可作为医用器官移植的供体、作为生物反

应器，以及用于家畜遗传改良、创建疾病实验模型等。但目前转基因动物的实际应用并不多，除单一基因修饰的转基因小鼠医学模型较早得到应用外，转基因动物乳腺生物反应器生产药物蛋白的研究已进行了 10 多年，目前在全世界范围内仅有 2 例药品进入 3 期临床试验，5～6 个药品进入 2 期临床试验；而由于生物学性状发生改良、可用来畜牧生产应用的转基因家畜品系至今没有诞生。转基因动物制作效率低、定点整合困难所导致的成本过高和调控失灵，以及转基因动物有性繁殖后代遗传性状出现分离、难以保持始祖的优良性状，是制约当今转基因动物实用化进程的重要原因。

（五）克隆动物产生的意义

① 从理论上证明了已分化的动物细胞是具有全能性的，在适当条件下，通过基因组的重新组织就可能发育成新个体。

② 从实际应用角度讲，克隆动物技术的成熟对动物资源的种质保存，尽可能多地保存地球生物圈内的生物多样性具有重要意义。

③ 克隆动物对培育优良物种也有重要意义。

④ 克隆动物还可以生产移植器官、培育优良畜禽品种，利用动物作为生物反应器生产药物和提供实验动物等几方面造福人类。

（六）克隆羊“多莉”成功的意义和反响

在 1997 年 2 月英国罗斯林研究所维尔穆特博士科研组公布体细胞克隆羊“多莉”培育成功之前，胚胎细胞核移植技术已经有了很大的发展。

“多莉”是世界上第一例经体细胞核移植出生的动物，是克隆技术领域研究的巨大突破。这一巨大进展意味着：在理论上证明了，同植物细胞一样，分化了的动物细胞核也具有全能性；在实践上证明了，利用体细胞进行动物克隆的技术是可行的，从而为大规模复制动物优良品种和生产转基因动物提供了有效方法。

同时也证明，人可以复制自己，这意味着以往科幻小说中的独裁狂人克隆自己的想法是完全可以实现的。因此，“多莉”的诞生在世界各国科学界、政界乃至宗教界都引起了强烈反响，并引发了

一场由克隆人所衍生的道德问题的讨论。各国政府有关人士、民间纷纷作出反应：克隆人类有悖于伦理道德。

克隆技术在基础研究中的应用也是很有意义的，它为研究配子和胚胎发生，细胞和组织分化，基因表达调控，核质相互作用等机理提供了工具。

在实践中，克隆动物的成功率还很低，维尔穆特研究组在培育“多莉”的实验中，融合了277枚移植核的卵细胞，仅获得了“多莉”这一只成活羔羊，成功率只有0.36%，同时进行的胎儿成纤维细胞和胚胎细胞的克隆实验的成功率也分别只有1.7%和1.1%，即使是使用“檀香山”技术，以分化程度较低的卵丘细胞为核供体，其成功率也只有百分之几。

此外，生出的部分个体表现出生理或免疫缺陷。以克隆牛为例，日本、法国等国培育的许多克隆牛在降生后两个月内死去；到2000年2月，日本全国已共有121头体细胞克隆牛诞生，但存活的只有64头。观察结果表明，部分犊牛胎盘功能不完善，其血液中含氧量及生长因子的浓度都低于正常水平；有些牛犊的胸腺、脾和淋巴腺未得到正常发育；克隆动物胎儿普遍存在比一般动物发育快的倾向，这些都可能是死亡的原因。

即使是正常发育的“多莉”，也被发现有早衰迹象。染色体的末端被称为端粒，它决定着细胞能够分裂的次数：每一次分裂端粒都会缩短，而当端粒耗尽后细胞就失去了分裂能力。1998年，科学家发现“多莉”的细胞端粒比正常的要短，即其细胞处于更衰老的状态。

除了以上的理论和技术障碍外，克隆技术（尤其是在人胚胎方面的应用）对伦理道德的冲击和公众对此的强烈反应也限制了克隆技术的应用。盲目禁止这方面的研究并不是明智之举，关键在于建立一定的规范，利用它为人类造福。

四、干细胞工程

实验表明，动物体内也有类似植物的具有全能性的细胞，如低等动物的鱼、两栖类等，从2细胞到囊胚期的细胞都具有全能性。高等动物从胚胎2细胞到64细胞以及内细胞团的胚胎细胞也具有

发育的全能性。而且在这些哺乳动物的已分化的组织和器官中都保留了一些能够分裂形成该组织或器官的未分化的原始细胞，这些细胞称为干细胞。

动物体内的这些干细胞能够不断地补充体内一些短命组织的细胞来源，如血液细胞、皮肤细胞以及精巢等，或者当某些组织或器官受到局部损伤时，它们可以再分裂形成新的该组织和器官，是体内的一种自我修复机制。这类具有再分裂功能的细胞分为三种类型：全能干细胞、多能干细胞和专能干细胞。

根据细胞的发育阶段，干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞。前者包括 ES 细胞、EG 细胞。当受精卵分裂发育成囊胚时，将内细胞团分离出来进行培养，在一定条件下，这些细胞可在体外“无限期”地增殖传代，同时还保持其全能性，因此被称为胚胎干细胞。

1998 年，美国科学家 Jumes Thomson 等首次取得了人类胚胎干细胞在体外的非分化增殖，他们从体外受精的人胚胎内细胞团分离胚胎干细胞，进行体外培养，并获得了成功，证明了人体胚胎干细胞与啮齿类动物有极为相似的特点，从而使胚胎干细胞可能被用来取代病人体内的坏损组织细胞，达到治疗疾病的目的。该研究的成功，被科学家认为是干细胞研究中一块重要的里程碑。

成体干细胞则可根据来源不同分为神经干细胞、血液干细胞、骨髓间质干细胞，表皮干细胞等。

1999 年 12 月美国科学家 Margarel Goodell 发现小鼠肌肉组织干细胞可以“横向分化”成血液细胞。这一发现很快被世界各地的科学家证实，并且发现人成体干细胞同样具有“横向分化”的功能。这既可克服由于异体细胞移植的免疫排斥，又可以克服胚胎细胞来源的不足以及其他社会伦理和法律问题。

到目前为止，科学家们利用干细胞培养出了多个器官组织，其中包括心脏、肾脏等人体关键器官的组织。以色列工学院的科学家首次从胚胎干细胞中培养出人类心脏组织，可以自然跳动，

并有新生心脏组织的电特性和机械性。这一成果表明了细胞移植治疗心脏病的巨大潜力。因此等待器官移植的病人不必再依赖于器官捐献。

在临床治疗方面，干细胞也在白血病、帕金森病、心肌梗死等疾病的治疗方面均有所建树。从 1979 年医学界首次发现胎儿的脐带血中含有能恢复白血病患者造血功能的细胞以来，脐血和胎盘受到越来越多医生的重视和利用。从 1998 年至今，从胎盘和脐带血中提取出来的血液已挽救了数百人的生命。

大量的研究成果表明，干细胞技术广泛应用于临床，治疗各种疑难病症、提供器官移植，促进康复、减轻老化、恢复青春等已为期不远。干细胞生物学和干细胞生物工程已成为继人类基因组大规模测序之后最具活力，最有影响和最有应用前景的生命学科。

干细胞技术的发展势必受到来自社会各方面的制约与争论。不过，相信随着干细胞生物工程研究的不段深入与发展，这些问题都会得到的妥善解决。另外，各国在大力推进研究的同时，也应该在法律法规方面给予充分的重视，及时制定和调整相关法规政策，以适应技术发展的需要。

五、试管婴儿

试管婴儿就是把精子和卵子从人体中取出来，放到特制的佩特里氏培养皿中让精子和卵细胞发生受精作用，受精卵经过培养后，再将其植入母体子宫，使其在体内发育成胎儿。由于受精作用发生在玻璃器皿中，就如同科学家用试管做实验一样，所以人们就把这样得到的婴儿形象地称为试管婴儿。

第六章　基因工程

随着对 DNA 双螺旋结构和遗传机制研究的逐步深入，特别是当人们了解到基因是经由 RNA 转录然后再翻译成蛋白质来表现其生物学功能以后，科学家们开始尝试在分子水平上去干预生物的遗传特性，改变其生物学性状，开始探讨如何利用其更好地服务于人类。

因此，从 20 世纪 70 年代开始，人们开始尝试将一种生物的 DNA 中的某个基因连接到另外一种生物的 DNA 链上去，将 DNA 重新组织一下，使之可以按照人类的愿望，设计出新的遗传物质并创造出新的生物类型，这与过去培育生物繁殖后代的传统做法完全不同。这种做法就像各种工程技术的工程设计一样，按照人类设定的图纸，将某种生物的基因与另外一种生物的基因重新拼接，产生新的基因组合，创造出新的生物或表现新的特性。这种完全按照人的意愿，由重新组装基因到新生物产生的生物科学技术，就称为“基因工程”，或者说是“遗传工程”。

第一节　基因工程的技术基础

随着基因工程技术理论上的进一步阐明和完善，限制性内切酶和连接酶、各种能够在宿主内进行自我复制的载体的发现和逆转录酶在病毒中的发现，为基因工程技术的实现提供了技术保障。

（一）基因工程的工具酶

1. 限制性内切酶

我们都知道，双链的 DNA 分子很小，其直径只有 20 埃，约相当于五百万分之一厘米，要对它们进行各种操作是非常困难的，因此基因工程实际上是一种微观的技术操作，对 DNA 的切割、连接与转运，必须通过特殊的手段才能实现。

限制性内切酶和限制酶是在20世纪60年代被发现的。1970年，美国约翰·霍布金斯大学的H. Smith发现流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）能迅速降解外源的噬菌体DNA，其细胞提取液可降解*E. coli* DNA，但不能降解自身DNA，从而找到*Hind*Ⅱ限制性内切酶，它能够在DNA中特异性地识别DNA序列中的GGATTC并进行切割。经研究发现，不同的限制性内切酶有特定的识别和切割位点，切割后可产生平末端或黏性末端。限制酶识别序列的长度一般为4～8个碱基，最常见的为6个碱基。当识别序列为4个和6个碱基时，它们可识别的序列在完全随机的情况下，平均每256个和4096个碱基中会出现一个识别位点（$4^4=256$，$4^6=4096$）。应用限制性内切酶可以把目的基因从供体DNA长链中准确地剪切下来。

自70年代以来，人们已经分离提取了400多种限制性内切酶。有了这些限制性内切酶，人们就可以随心所欲地进行DNA分子长链的切割了。

2. 连接酶

连接酶是科学家们发现并提取出的又一种酶，这种酶可以将两个DNA片段连接起来，修复好DNA链的缺口，即DNA连接酶。DNA连接酶可以将两种具有相同末端的DNA片段重新连接起来，完成不同基因的体外人工拼接。现已发现几种不同来源或作用于不同底物的连接酶。

T4 DNA连接酶的分子量为68kD，是基因工程操作中常用的连接酶，它催化DNA5′磷酸基与3′羟基之间形成磷酸二酯键。反应底物为黏端、切口、平端的DNA或RNA。低浓度的聚乙二醇PEG（一般为10%）和单价阳离子（150～200mol/LNaCl）可以提高此酶的平端连接速率。

3. 反转录酶

依赖于RNA的DNA聚合酶，它有5′→3′合成DNA聚合活性，但是无3′→5′外切活性。它来自AMV（禽成髓细胞瘤病毒）或Mo-MLV（Moloney鼠白血病病毒，又称M-MuLV），它可以

将 RNA 逆转录成 DNA。

4. DNA 聚合酶

主要活性是催化 DNA 的合成（在有模板，引物，dNTP 等的情况下）及其相辅的活性。分为以下几种：①大肠杆菌 DNA 聚合酶Ⅰ；②Klenow DNA 聚合酶；③耐热 DNA 聚合酶。

随后，又发现了基因操作常用的各种修饰酶，主要有 T4 多核苷酸激酶、碱性磷酸酶、核酸酶、T7DNA 聚合酶以及末端转移酶等，这些修饰酶在实践中被广泛地应用。

以上介绍了许多分子克隆中的常用工具酶，但在实际工作中使用的酶远不止这些，随着生物科学和技术的发展，还会有新的酶用于基因操作。

（二）分子克隆载体

要想外源基因能够在宿主中进行表达，必须寻找一种分子小、能自由进出细胞，而且在装载了外来的 DNA 片段后仍能照样复制的运载体。这种能将外源 DNA 或基因携带入宿主细胞的工具称为载体，载体是基因操作的核心工具。现在，已知的可用作外源基因运载工具的载体主要有质粒、病毒、黏粒和噬菌体等。

1. 质粒载体

质粒是细菌染色体外的遗传物质，绝大多数的质粒都是共价闭合环状双螺旋 DNA 分子。因为质粒能在细菌内进行自我复制、稳定遗传，而且还可携带外源基因，因此，经过改造后是基因工程常用的理想载体，如图 6-1 所示。

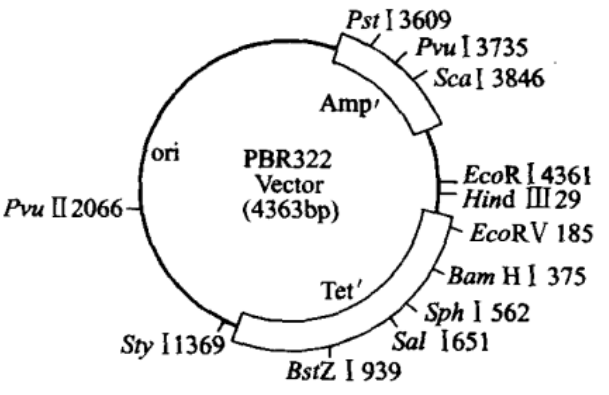

图 6-1　质粒载体 pBR322 示意图

（1）质粒的基本特性

① 质粒的复制　质粒作为理想的载体是因为质粒能自由进出细菌细胞，当用限制性内切酶把它切开，再给它连接上一段外来的 DNA 片段后，它依然能自我复

制。通常一个质粒含有一个与相应的顺式作用控制要素结合在一起的复制起始区（整个遗传单位定义为复制子）。在不同的质粒中，复制起始区的组成方式是不同的。在大肠杆菌中使用的大多数载体都带有一个来源于 pMB1 质粒或 ColE1 质粒的复制起始位点。

② 质粒的拷贝数　质粒拷贝数分为严谨型与松弛型。严谨型质粒每个细胞中拷贝数有限，大约几个；松弛型质粒拷贝数较多，可达几百。

③ 质粒的不相容性　两个质粒在同一宿主中不能共存的现象称质粒的不相容性，它是指在第二个质粒导入后，在不涉及 DNA 限制系统时出现的现象。不相容的质粒一般都利用同一复制系统，从而导致不能共存于同一宿主中。

（2）质粒载体的种类　质粒载体主要分为克隆载体（克隆载体主要用于扩增、操作或保存 DNA 片段）和表达载体（该类载体是在常规克隆载体的基础上衍生而来的，主要增添了强启动子，以及有利于表达产物分泌、分离或纯化的元件）。各种表达载体的不同之处在于构成其表达元件的差异。

① 融合蛋白表达载体　通过以融合蛋白的形式表达目的蛋白，并利用载体编码的蛋白或多肽的特殊性质可对目标蛋白进行特异性地分离和纯化。用作分离的载体蛋白被称为标签蛋白或标签多肽（Tag），常用的有谷胱甘肽转移酶（GST）、六聚组氨酸肽（polyHis-6）等。

② 非融合蛋白表达载体　使用的启动子主要包括强启动子 tac 和杂合启动子 trp-lac 等，利用这些启动子可直接表达外源基因。

③ 分泌型表达载体　这类载体将外源基因表达后，可以利用信号肽序列作为融合标签使这些表达的蛋白分泌到细胞外或细胞周质区中。这种表达形式可避免这些蛋白质被细胞内的蛋白酶降解掉，同时也可以使表达的蛋白进行正确折叠，使目标蛋白具有生物学活性。现在经常使用的信号肽有碱性磷酸酶的信号肽、蛋白质 A 的信号肽。

2. 穿梭载体

穿梭载体是一类能够在两种不同宿主中进行复制、增殖和选择的载体。如有些载体既能在原核细胞中复制又能在真核细胞中复

制。这类载体主要是质粒载体。在哺乳动物、植物、昆虫细胞等细胞中使用的表达载体或其他载体，一般都有在大肠杆菌中复制的元件，因此都具备穿梭载体的特征。

3. 转移载体

在转基因植物和转基因动物的研究中，经常会涉及将某个基因或某些基因整合或插入到染色体中去的工作，这类载体被称为转移载体。根据整合方式的不同可分为定点整合和随机整合，按其作用来分可归为目标基因的插入或敲除以及随机突变体库的构建。

4. YAC 人工染色体载体

YAC 人工染色体载体是利用酿酒酵母的染色体的复制元件构建而成的一类载体。该载体主要是用来构建大片段 DNA 文库，特别用来构建高等真核生物的基因组文库，并不用作常规的基因克隆与表达。YAC 文库装载的 DNA 片段的大小一般可达 200～500kb，有的可达 1Mb 以上，甚至达到 2Mb。大型基因组片段可通过 YAC 载体转移到动物或动物细胞系中，进行功能研究。利用 YAC 人工染色体载体构建大片段 DNA 文库的过程见图 6-2。

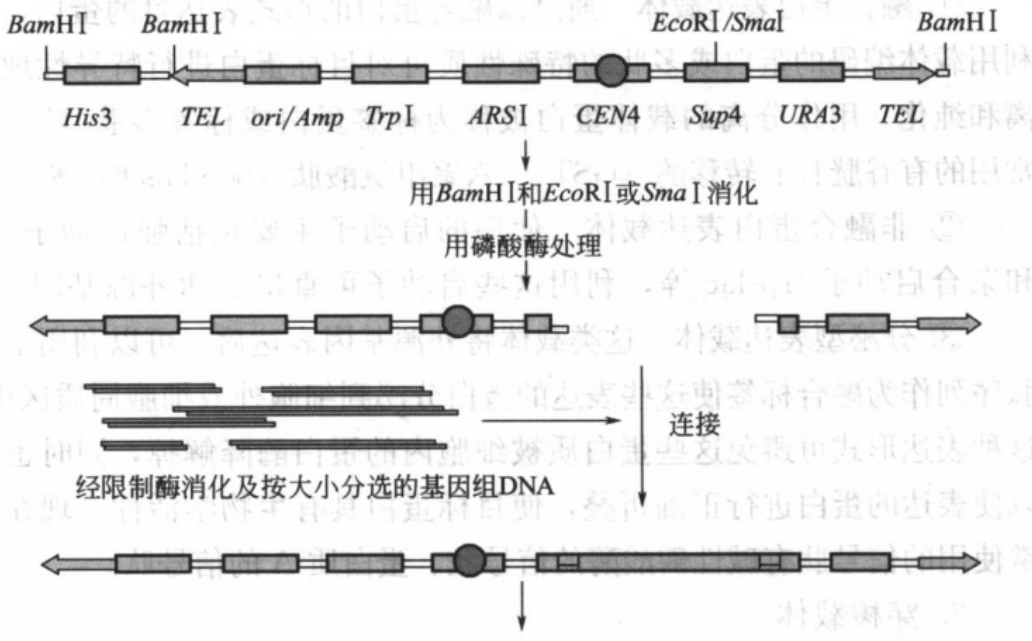

图 6-2　利用 YAC 人工染色体载体构建大片段 DNA 文库步骤

（三）大分子的分离和分析技术

进行 DNA 分离的方法主要有琼脂糖凝胶电泳和 PAGE 两种分离方法。从琼脂糖凝胶中回收 DNA 的方法很多，可以根据待回收的 DNA 片段大小选择合适的方法，如透析袋回收、分离柱回收等，现在使用比较多的是分离柱回收。RNA 的分离纯化过程中最主要的问题是要避免因 RNA 酶的污染而使目标分子被降解。

1. DNA 的分离和纯化

现以质粒 DNA 的分离为例介绍 DNA 的分离与制备过程。

质粒 DNA 的分离和纯化采用碱裂解法或质粒 DNA 纯化试剂盒（具体过程见图 6-3）。碱裂解纯化质粒 DNA 方法如下：培养过夜的含有质粒 DNA 的工程菌，经离心收集菌体，然后分别利用以下的三种溶液进行提取。

溶液Ⅰ：加含有 50mol/L 的葡萄糖的溶液Ⅰ悬浮细胞。

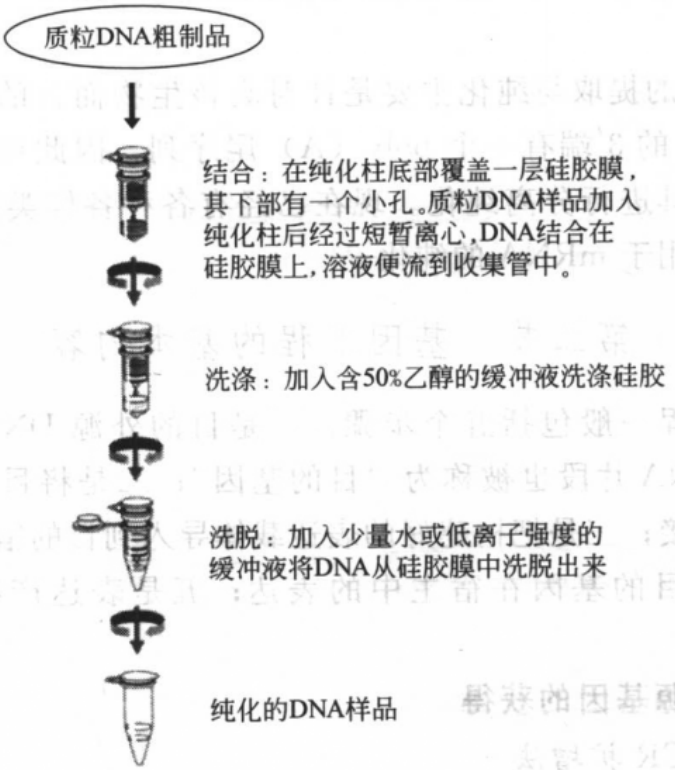

图 6-3　质粒 DNA 纯化试剂盒提取纯化 DNA 的示意图

溶液Ⅱ：加含有 0.2mol/L NaOH 和 1%SDS 的 2 倍溶液Ⅰ体积的裂解液进行裂解菌体。

溶液Ⅲ：加 1.5 倍溶液Ⅰ体积的高浓度的醋酸钾缓冲液（3mol/L，pH4.6）进行中和。然后经高速离心，上清液即为质粒 DNA 粗制品。然后用酚、氯仿进行抽提，乙醇沉淀进行精制。

提取得到的 DNA 可以用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2. RNA 的抽提和纯化

目前使用最多的 RNA 提取试剂为 TRIZOL，是使用最广泛的抽提总 RNA 的专用试剂，由 Gibco 公司根据酚-异硫氢酸胍抽提法设计，主要由苯酚和异硫氢酸胍组成，适合任何生物材料的 RNA 提取。简要地提取流程如下：首先对样品的组织或细胞进行研磨，使之裂解；然后加入该试剂后，它可保持 RNA 的完整，同时能进一步破碎细胞并溶解细胞成分；加入氯仿抽提，离心，水相和有机相分离；收集含 RNA 的水相；通过异丙醇沉淀，可获得 RNA 样品。

mRNA 的提取与纯化主要是针对真核生物而言的，由于真核生物 mRNA 的 3′端有一个 poly（A）尾序列，因此可用亲和色谱的方法来对其进行分离纯化。现在已经有各种各样类型的 mRNA 纯化试剂盒用于 mRNA 的纯化。

第二节　基因工程的基本内容

基因工程一般包括五个步骤：一是目的外源 DNA 片段的获得，这种 DNA 片段也被称为“目的基因”；二是将目的基因与表达载体的连接；三是把构建好的表达载体导入到目的宿主细胞或个体中；四是目的基因在宿主中的表达；五是表达产物的分离与纯化。

一、外源基因的获得

（一）PCR 扩增法

PCR 技术是通过模拟体内 DNA 复制的方式，在体外有选择性地将染色体或 DNA 上某个特殊区域扩增出来的技术。其反应过程

与 DNA 在生物体内的复制一样有三个步骤：模板变性，引物与模板复性，延伸。

1. PCR 扩增的原理与步骤

将模板 DNA 置于 92～96℃进行变性（denaturation）处理，使双链 DNA 在高温下解链成为两条单链；然后退火（annealing），将温度降至 37～72℃，使引物与模板的互补区相结合；最后，在 72℃条件下，DNA 聚合酶将 dNTP 连续加到引物的 3′-OH 端，合成 DNA，这个步骤称为延伸（extension）。这三个热反应过程称为一个循环，经过 20～40 个循环可扩增得到大量位于两条引物之间的目的 DNA 片段。

2. PCR 扩增产物的 A/T 克隆

获得 PCR 产物后，需要对这些产物进行酶切消化、测序分析等操作，必须将其克隆到一个载体上。现在应用比较多的载体为 A/T 克隆载体。因为 Taq DNA 聚合酶具有末端转移酶的活性，可在 PCR 产物的 3′末端添加一个核苷酸，通常为 A。因此，Taq DNA 聚合酶扩增的产物可与 T-载体进行黏端互补连接，达到高效克隆 PCR 产物的目的。T-载体最初由 Promega 公司开发出商品，并一直沿用到现在。

Invitrogene 公司开发了一种将拓扑异构酶与 T-载体相结合的 PCR 产物快速克隆系统 pCR-TOPO，无需用 DNA 连接酶进行连接。pCR-TOPO 载体也是一种 T 载体，只是在其 3′末端的突出 T 上共价结合了一个拓扑异构酶Ⅰ，当带 3′末端的突出 A 的 PCR 产物与该 T 载体互补配对时，拓扑异构酶Ⅰ就将该缺口连接起来。

（二）构建基因文库

基因文库指某个生物的基因组 DNA 或 cDNA 片段，通过与适当的载体在体外重组后，转化宿主细胞，并通过一定的选择机制筛选后得到大量的阳性菌落（或噬菌体），即所有菌落或噬菌体的集合。按照外源 DNA 片段的来源，可将基因文库分为：基因组 DNA 文库（genomic DNA library）和 cDNA 文库（complementary DNA library）。

基因文库构建的基本程序包括：（1）提取组织或器官的 DNA，制备合适大小的 DNA 片段，或提取组织或器官的 mRNA 并反转录成 cDNA；（2）DNA 片段或 cDNA 片段与经特殊处理的载体连接形成重组质粒 DNA；（3）重组质粒 DNA 转化宿主细胞或体外包装后侵染受体菌；（4）含阳性重组质粒的菌落或噬菌斑的选择。

文库构建以后可以通过表型筛选法、杂交筛选和 PCR 筛选、免疫筛选法筛选目标基因。

（三）化学合成

根据已知的目的基因序列，可以按照基因的碱基排列顺序，利用 DNA 合成仪在体外人工合成目的基因片段。化学合成法获取目的 DNA 片段主要适用于比较短的片段，如果目的片断比较长，可以采取分段合成，然后在连接酶的帮助下，将它们拼接在一起。化学合成的 DNA 片段，除了可以作为合成基因的元件，也可以用来作为 DNA 序列分析的探针，以及 PCR 扩增的引物进行应用。

二、外源基因与载体的连接

要想使目的基因片段通过转录、翻译成具有生物学功能的蛋白质，必须将该基因与表达载体相连接，使其在表达载体的启动子控制之下得以表达。外源 DNA 片段和质粒载体的连接反应方法有以下几种。

（一）带有非互补黏性末端的 DNA 片段与载体的连接

各种常用的质粒载体均带有多个由不同限制性内切酶识别的序列组成的多克隆位点，因而几乎总能找到与外源 DNA 片段末端匹配的限制酶切位点的载体。用两种不同的限制性内切酶进行消化载体与片段，可以产生带有非互补的黏性末端，很容易将 DNA 片段克隆到载体上。也可在 PCR 扩增时，在 DNA 片段两端人为加上不同酶切位点以便与载体相连。

（二）带有相同的黏性末端的 DNA 片段与载体的连接

将目的基因片段用一种酶或同尾酶处理后可得到两个相同的黏性末端。质粒载体也必须用同一种酶消化，得到同样的两个相同黏性末端。在连接反应中，外源基因片段和质粒载体 DNA 均可能发

生自身环化或几个分子串联形成寡聚物，而且正反两种连接方向都可能有。因此，可以将载体 DNA 的 5′磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉，最大限度地抑制质粒 DNA 的自身环化，使带 5′端磷酸的外源 DNA 片段可以有效地与去磷酸化的载体相连。

（三）带有平末端

有些限制性内切酶切割消化后产生的末端是平末端，或采用 DNA 聚合酶将黏性末端补平产生平末端。平端的连接效率比黏性末端要低得多，故在其连接反应中，T4 DNA 连接酶的浓度和外源 DNA 及载体 DNA 浓度均要高得多，才能得到比较好的结果。

（四）加接头

在有些特殊情况下，外源 DNA 分子的末端与所用的载体酶切后的末端无法相互匹配，可以采取在线状质粒载体末端或外源 DNA 片段末端接上合适的接头使其匹配的方法进行连接，也可以采用 DNA 聚合酶 I 的 klenow 大片段部分填平片段与载体的 3′末端，使不相匹配的末端转变为平末端后再进行连接。

三、重组 DNA 导入宿主及阳性克隆筛选

构建好的表达载体只有在细胞内才能进行复制和表达，因此需要将表达载体导入受体细胞。对于不同的生物细胞，有不同的导入方法。对于大肠杆菌等这类原核细胞，可以采用转化的方法将载体质粒导入其中。转化是将外源 DNA 分子引入受体细胞，使之获得新的遗传性状的一种手段，它是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究领域的基本实验技术。

转化过程所用的受体细胞经过一些特殊方法（如电击法，$CaCl_2$）的处理后，细胞膜的通透性发生了暂时性的改变，成为能允许外源 DNA 分子进入的感受态细胞。进入受体细胞的 DNA 分子通过复制、表达实现遗传信息的转移，使受体细胞出现新的遗传性状。将经过转化后的细胞在筛选培养基中培养，采用 PCR 扩增、酶切鉴定等方法筛选出含有表达质粒的转化子，即基因工程菌株，用于后续的表达研究。目前常用的感受态细胞制备方法有 $CaCl_2$ 法，该法简便易行，且其转化效率完全可以满足一般实验的要求，

制备出的感受态细胞暂时不用时，可加入占总体积15%的无菌甘油于－70℃保存，因此$CaCl_2$法为使用更广泛。

对于宿主为动物细胞、酵母菌等，可以采用脂质体介导、电穿孔和显微注射等方法将表达载体导入到宿主细胞或个体当中去，实现外源基因的表达。

四、外源基因的表达

进入寄主细胞的重组DNA分子，其中的外源目的基因能否表达，表达效率的高低，仍有很大的差别。不少基因表达工作，因表达效率不够高而裹足不前。实际上，位于目的基因前面的启动子常常是表达效率的关键。所以，要得到目的基因的高效表达，关键首先在于选择合适的载体，尤其是寻找适合目的基因的高表达启动子。

用来进行基因表达的系统主要有原核表达系统和真核表达系统两大类，其中原核表达系统的宿主主要是大肠杆菌。当基因工程菌构建完成后，就可以进行蛋白质的表达。根据所采用的启动子的种类，可以采取不同的诱导方式，有的启动子需要热诱导，有的需要用IPTG进行诱导。真核表达系统分为酵母表达系统、动植物表达系统和昆虫杆状病毒表达系统等。

五、表达产物的分离与纯化

基因工程的一个主要目的就是要得到高度纯化并具有生物活性的目的蛋白。与普通蛋白质的制备过程一样，基因工程产物的纯化也主要采用物理、化学和生物等各方面的方法。蛋白质的制备一般分为细胞的破碎，提取和分离纯化几个阶段。

细菌细胞的破碎主要有超声波处理、反复冻融法和化学处理法等几种方法。

大多数蛋白质都可溶于水、酸、碱或盐溶液中，少数脂溶性的蛋白质则溶于乙醇、丙酮、丁醇等有机溶剂中。因此，可采用不同溶剂提取分离和纯化蛋白质。含盐缓冲液对蛋白质稳定性好、溶解度大、是提取蛋白质最常用的溶剂。蛋白质是两性电解质，当用酸、碱溶液提取时，提取液的pH值应选择在偏离等电点两侧的

pH 范围内。一般来说，碱性蛋白质用偏酸性的提取液提取，而酸性蛋白质用偏碱性的提取液。

蛋白质的分离纯化方法很多。根据蛋白质溶解度不同可以采取以下方法：①蛋白质的盐析，②等电点沉淀法，③有机溶剂沉淀法。根据蛋白质分子大小进行分离的方法有：①透析与超滤，②凝胶过滤。此外，可选择的方法还有离子交换色谱和亲和色谱等方法。

蛋白质在组织或细胞中是以复杂的混合物形式存在，每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质，因此蛋白质的分离、提纯和鉴定是生物化学中的重要的一部分，至今还没的单独或一套现成的方法能移把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来，因此实践中常将几种方法联合使用。

第三节　基因工程的应用

一、大肠杆菌表达 Hemolin 基因

1. PCR 法获得 Hemolin 目的片段

经对 Hemolin 蛋白中信号肽预测分析可知，信号肽的切割位点在第十八和十九个氨基酸之间。因此，结合原核表达载体 pGEX-6p-1 上的多克隆位点和 Hemolin 序列中的酶切位点，选择 *Eco*RⅠ、*Sma*Ⅰ两个酶切位点分别加在序列的前边和后边，同时保证读码框的准确。通过 GeneTool 优化设计出引物如下：

F：5′-TACGAATTCATGCTTCCTGTGGATAA-3′

R：5′-GATCCCGGGGTTCACTTGGACCAAGGACTCGA-3′

进行 PCR 反应扩增出目的条带，回收后连接到 pMD-18T 载体上，转化宿主菌 DH5α，培养过夜。然后通过 PCR 初步检测后提取质粒进行酶切鉴定，将鉴定正确的单克隆菌落进行测序。结果表明获得了 1.3kb 的目的条带，与预期结果一致。

2. 表达载体 pGEX-6p-1-H 的构建

分别对鉴定正确的插入有目的基因 Hemolin 片断的 T 载体和原核表达载体 pGEX-6p-1 进行 *Eco*RⅠ、*Sma*Ⅰ双酶切。酶切后进

行 DNA 琼脂糖凝胶电泳，分别对目的条带进行回收。

采用宝生物公司的 DNA 连接反应试剂盒进行连接反应。10μL 连接反应体系中含有连接缓冲液 5μL；载体与目的基因共 5μL，它们的摩尔数比为 1∶5～1∶10，将三者混匀后 16℃连接过夜。

将连接产物转化 100μL 钙化的感受态细胞 DH5α，挑取单菌落培养过夜，提取质粒，进行酶切鉴定。鉴定时采用 *Eco*R Ⅰ、*Sma* Ⅰ进行双酶切，结果正确的单克隆菌落用于提取质粒 DNA 进而用于基因表达。

3. 转化大肠杆菌 BL21

将构建好的 pGEX-6p-1-Hemolin 转化蛋白酶缺陷型的大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞。

4. Hemolin 在原核细胞中的表达

挑取单菌落于 37℃培养过夜，按 1∶100 继代，当细菌 OD 值达到 0.6 左右，加入诱导剂后分别使细菌在 37℃、28℃、20℃下诱导表达。诱导 6h 后离心收集菌体，按细菌质量与溶液质量为 1∶5加入 PBS 重悬，进行超声破碎（7s＋7s，破碎 10min）。破碎后于 10000r/min 离心 20min，分别收集上清和下层沉淀，在沉淀中加入与上清等体积的 PBS 重悬。按照同样的方法进行裂解，取 20μL 进行蛋白电泳确定蛋白在细胞中的分布。

二、转基因植物

自 20 世纪 80 年代以来，随着生物技术的迅速发展，转基因植物大量出现，有的转基因作物已进入大田试验阶段，有些则已投放市场。目前转基因植物的研究主要集中在抗病虫、耐盐碱、抗除草剂、提高光合作用效率、提高必需氨基酸含量等方面。

转基因植物的实现主要分为三个步骤：①以人工方法在现有的生物中取得所需要的 DNA 片断，利用 mRNA 复制所需的 DNA，即人工合成基因；②将人工合成的基因输入到新细胞当中去，并使其与新细胞中原有的 DNA 相组合，即 DNA 的重组；③筛选和培养有外源基因的细胞或组织，使其产生正常健康的转基因植物，通过有性繁殖将优良性状传递给下一代。

1. 转基因植物的步骤

(1) 寻找目标基因　根据所要达到的目的，从其他植物、微生物或动物中分离有用的基因。

(2) 取得目标基因　可以采用基因分离或人工合成的方法取得所需要的 DNA 片断。利用内切酶或逆转录酶可以将生物细胞中的天然基因分离出来。亦可以通过确定所需基因的遗传密码排列顺序来人工合成 DNA。

(3) 构建基因表达的载体　基因从一种生物体内转移到另外一种生物体内，并使之表达，需要一定的载体。现在主要有质粒载体、病毒载体等，其中以质粒载体最为常见。

(4) 外源基因转移到植物体内的方法　通过以下几种方法将外源基因导入植物：农杆菌介导；基因枪，电击；植物病毒。

2. 转基因植物的应用

(1) 抗虫害方面　1987 年 Vaeck 等首次证明转苏云金杆菌杀虫蛋白基因的烟草能抗烟草天蛾，此后在番茄上也获得了成功，可抗番茄果虫和番茄蠹蛾。根据植物偏爱的密码子将经过改造的杀虫蛋白基因转入棉花后已获得了抗虫棉。抗虫棉花的育成将对减少杀虫剂的用量、保护环境有巨大的作用。

从豇豆、马铃薯等作物中分离的蛋白酶抑制剂基因已证明对不少昆虫有广谱抗性。我国上海生物化学研究所从慈姑及葫芦科作物中分离出蛋白酶抑制剂基因，并正在用蛋白质工程加以改造，以期获得杀虫力更强、更广谱的抗虫基因。

(2) 抗病毒方面　自 1986 年美国把烟草花叶病毒的外壳蛋白基因转移到番茄体内，培育出抗烟草花叶病毒的番茄植株以后，抗黄瓜叶病毒的转基因植株也陆续获得成功。我国科学家利用转基因方法，已经培育出抗病毒烟草和抗病毒番茄，并且已开始进行田间实验。

(3) 抗杂草方面　农业上因杂草危害减产由 20 世纪 40 年代的 8%上升为 12%。目前广泛使用的除草剂大部分为非选择性除草剂，因此只能在播种前使用。通过基因工程培育出抗除草剂的作

物，不但可以降低化学除草剂的使用量，减少环境污染，而且给轮作或间作中作物的选择以更大的灵活性。

三、转基因动物

转基因动物技术是指通过基因工程技术将体外重组的外源基因导入受精卵或早期胚胎，经过同源重组培育出转基因动物的技术。用来将外源基因导入动物体内的方法主要有以下几种。

1. 显微注射法

显微注射法是目前最常用的建立转基因动物的方法之一，通过显微注射将外源基因直接注入实验动物的受精卵，使外源基因整合到染色体上，再通过胚胎移植技术将整合有外源基因的受精卵移植到受体的子宫内继续发育，进而得到转基因动物。

显微注射法虽然是目前最经典可靠、应用最广泛的方法，但它的整合率低，只有 1%～5%，且成本高，使得该技术的应用受到了很大的限制。

2. 逆转录病毒感染法

逆转录病毒的核酸为一条单链的 RNA 分子，当其进入细胞后，在反转录酶作用下，病毒 RNA 反转录为双链 DNA 分子，整合到细胞核基因组中。该技术的基本过程是把重组的反转录病毒载体 DNA 包装成高滴度的病毒颗粒，将此病毒颗粒注射到囊胚腔内或将去除透明带的胚胎与分泌病毒的细胞共培养，使携带外源基因的反转录病毒 RNA 在感染过程中整合到宿主细胞的染色体内，达到外源基因转移到胚胎的目的。

逆转录病毒作为载体具有潜在的致癌性，而且获得的子代动物嵌合体的比例大，其载体的构建较为复杂。逆转录病毒作为载体的另一缺陷是复制大量载体 DNA 所需的辅助病毒基因组也可能与目的基因一起整合到同一细胞核中。因此，此项技术的应用亦受到了一定的限制。

3. 精子载体法

该方法基本原理是将外源基因与精子共同孵育，在受精过程中使精子携带外源基因进入卵中，从而使外源基因整合到染色体中。

目前精子载体法尚处于完善和发展阶段，必须对此技术的理论和实践加以深入研究。这种技术在大的转基因动物研究中预示着良好的应用前景。

4. 转基因动物的应用

转基因动物技术的实用意义是：

① 生产出性状优良的家畜家禽，如长得快的，繁殖力高的，能抗病的等；

② 利用动物体作为反应器，生产珍贵的蛋白质，如一些只能从人体内提取的蛋白质；

③ 建立动物模型，如老年痴呆小鼠模型，用来进行人类老年痴呆疾病的研究。

④ 生产玩赏动物，如同猫一样大的小马，如同鼠一样大的兔子，以及各种不同毛色和花纹的观赏动物。

在转基因动物方面，我国也取得了许多可喜的成果，目前已获得了转基因鱼、兔、鸡等多种转基因动物。1998 年 2 月中国科学家又获得了在所分泌的乳汁中含有蛋白凝血因子 X 的转基因山羊。

四、转基因产品的争议

随着植物转基因技术的迅猛发展，转基因食品的广泛应用，其安全性已引起了人们的广泛关注。虽然从本质上来讲，转基因植物育种和常规育成的品种是一样的，两者都是在原有品种的基础上对其一部分基因性状进行修饰，或增加新特性，或消除原来的不利性状。但是，常规的有性杂交育种方法仅仅局限于同种间和近缘种之间，而转基因植物却突破了这一局限，其外源基因可以来自植物、微生物甚至动物。在这种情况下，人们对可能出现的新组合、新性状是否会影响人类健康和生物环境还缺乏足够的认识和了解。

从目前来说，我们还不可能很精确地预测某一个外源基因在新的遗传背景中会产生什么样的相互作用。并且，转基因植物还可以对它所在的环境产生一定的影响。比如现在应用最多的抗除草剂基因就可能通过同属野生植物异花传粉而逐渐扩散进入自然界，从而使杂草的控制变得更加困难；而抗虫、抗病基因也有可

能通过类似的途径转移到环境，给野生种群带来选择优势而变得无法收拾。

虽然现在一般通过生殖隔离（设置缓冲作物带和隔离区）来防止基因漂流至临近作物，但若进行大规模生产和推广时就会难以控制。另外，转基因作物还可能造成对微生物的影响，Hoffman 等就曾发现转基因油菜中的基因可转至黑曲霉中，虽然机制还不明确，但至少存在这个事实。

自然界中存在着植物病毒间的异源重组，病毒的异源包装（转移包装）可以改变其宿主范围。转基因植物表达的病毒外壳蛋白在体外实验中可以包装入侵的另一种病毒的核酸，产生一种新病毒，虽然在小规模的田间实验中并未发现这种情况，但长期的大规模生产应用中是否也是怎样呢？此外，公众对转基因植物的接受性和标签问题也是我们应该考虑的问题。

由此可见，植物基因工程是一柄双刃剑，在造福于人类的同时也可能毁灭人类，甚至整个地球。这就要求我们在大力发展的同时注意其安全性，不断完善理论和技术，使其更好地为人类服务。

第七章　蛋白质工程与酶工程

蛋白质工程是以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系为基础，通过有目的的分子设计，或人工直接合成蛋白质（多肽），或利用基因工程手段，对已知或未知蛋白质进行定向改造，获得比天然蛋白更优良、更符合人们需要的新型蛋白质的过程。

酶工程就是指将酶所具有的生物催化作用，借助工程学的手段，应用于生产、生活、医疗诊断和环境保护等方面的一门科学技术。概括地说，酶工程是由酶制剂的生产和应用两方面组成的。酶工程的应用主要集中于食品工业、轻工业以及医药工业中。日常生活中所见到的加酶洗衣粉等，就更是酶工程最直接的体现了。酶工程的重点在于对已存酶的合理充分利用，而蛋白质工程的重点则在于对已存在的蛋白质分子的改造。当然，随着蛋白质工程的发展，其成果也会应用到酶工程中，使酶工程成为蛋白质工程的一部分。

第一节　蛋白质工程

一、蛋白质工程的产生、发展及意义

蛋白质工程是在基因重组技术、生物化学、分子生物学、分子遗传学等学科的基础之上，融合了蛋白质晶体学、蛋白质动力学、蛋白质化学和计算机辅助设计等多学科而发展起来的新兴研究领域。其内容主要有以下几个方面：根据需要合成具有特定氨基酸序列和空间结构的蛋白质；确定蛋白质化学组成、空间结构与生物功能之间的关系。在此基础之上，实现从氨基酸序列预测蛋白质的空间结构和生物功能，设计合成具有特定生物功能的全新的蛋白质，这也是蛋白质工程最根本的目标之一。

（一）蛋白质工程的产生与发展

人们通过基因工程技术已经能够大规模生产生物体内微量存在

的活性物质，并借助转基因而改变动植物性状，得以在人类医疗保健中进行基因诊断和基因治疗。例如利用大肠杆菌为人类生产出了胰岛素，牛的乳腺生物反应器为人类制造出了蛋白质类药物，也实现了世界上现有基因在转基因生物中的表达。但人们也发现了一个新问题，来源于生物体内的天然蛋白质是在长期进化过程中形成的，它的结构、性能不能完全满足人类生产和生活的需要，这些蛋白质只是适应生物自身的需要，而对它们进行产业化开发往往不合意，于是要对现有蛋白质进行改造，制造出目前从天然蛋白质中找不到的蛋白质。这样人们又开始了新一轮的探索，蛋白质工程应运而生了。蛋白质工程是20世纪80年代初诞生的一个新兴生物技术领域，它一出现就因其重要的理论意义和广阔的应用前景而备受学术界和产业界的广泛重视。

（二）蛋白质工程产生的意义

1. 蛋白质工程能够解决工业生产中蛋白质的稳定性问题

在过去研究的几千种蛋白质（酶）中，只有极少数可以应用于工业生产，绝大多数都不能应用于工业生产，这些蛋白质虽然在自然状态下有活性，但在工业生产中没有活性或活性很低。这是因为工业生产中每一步的反应体系中常常会有酸、碱或有机溶剂存在，反应温度较高，在这种条件下，大多数蛋白质会很快变性失活。提高蛋白质的稳定性是工业生产中一个非常重要的课题。一般来说，通过蛋白质工程，可以提高蛋白质的稳定性包括：延长酶的半衰期，提高蛋白质的热稳定性，延长药用蛋白的保存期，抵御由于重要氨基酸氧化引起的活性丧失等。

众所周知，干扰素是一种抗病毒、抗肿瘤的药物。将人的干扰素的cDNA在大肠杆菌中进行表达，产生的干扰素的抗病毒活性为10^6 U/mg，只相当于天然产品的十分之一，虽然在大肠杆菌中合成的β-干扰素量很多，但多数是以无活性的二聚体形式存在。为什么会这样？如何改变这种状况？研究发现，β-干扰素蛋白质中有3个半胱氨酸（第17位、31位和141位），推测可能是有一个或几个半胱氨酸形成了不正确的二硫键。研究人员将第17位的半胱氨

酸，通过基因定点突变改变成丝氨酸，结果使大肠杆菌中生产的β-干扰素的抗病性活性提高到10^8U/mg，并且比天然β-干扰素的储存稳定性高很多。

2. 蛋白质工程能够深入揭示生命现象的本质及规律

在基础理论研究方面，蛋白质工程是研究多种蛋白质的结构和功能、蛋白质折叠、蛋白质分子设计等一系列分子生物学基本问题的一种新型的、强有力的手段。通过对蛋白质工程的研究，可以深入地揭示生命现象的本质和生命活动的规律。

蛋白质工程的崛起主要是工业生产和基础理论研究的需要。而结构生物学对大量蛋白质分子的精确立体结构及其复杂的生物功能的分析结果，为设计改造天然蛋白质提供了蓝图。分子遗传学以定点突变为中心的基因操作技术为蛋白质工程提供了手段。

二、蛋白质工程的主要研究内容

（一）蛋白质结构分析

蛋白质工程的核心内容之一就是收集大量的蛋白质分子结构的信息，以便建立结构与功能之间关系的数据库，为进行蛋白质结构与功能之间关系的理论研究奠定基础。三维空间结构的测定是验证蛋白质设计的假设，即证明是新结构改变了原有生物功能的必需手段。

蛋白质的结构分析主要包括一级、二级、三级与四级结构研究，以及形成这些结构（主要是立体结构）的机理和一般规律。

（二）蛋白质结构与功能的关系

根据天然蛋白质结构与功能分析建立起来的数据库里的数据，可以对某一氨基酸序列肽链进行空间结构和生物功能进行预测；反之也可以根据特定的生物功能，设计蛋白质的氨基酸序列和空间结构。通过基因重组等实验可以直接考察分析结构与功能之间的关系；也可以通过分子动力学、分子热力学等，根据能量最低、同一位置不能同时存在两个原子等基本原则分析计算蛋白质分子的立体结构和生物功能。虽然这方面的工作尚在起步阶段，但可预见将来能建立一套完整的理论来解释结构与功能之间的关系，用以设计、预测蛋白质的结构和功能。

（三）蛋白质的改造

可以通过物理、化学及复杂的基因重组等方法对蛋白质进行改造。采用物理、化学法可以对蛋白质进行变性、复性处理，修饰蛋白质侧链官能团，分割肽链，改变表面电荷分布促进蛋白质形成一定的立体构象等；采用生物化学法使蛋白酶选择性地分割蛋白质，利用转糖苷酶、酰酶等对其侧链化学基团进行修饰。以上方法只能对相同或相似的基团或化学键发生作用，缺乏特异性，不能针对特定的部位起作用。基因重组技术，不但可以改造蛋白质，而且可以实现从头合成全新的蛋白质。根据蛋白质的结构规律和预期功能，设计目的蛋白的结构，或直接人工合成基因，再通过原核或真核表达系统，获得目的蛋白，并对其结构与功能进行鉴定。

三、蛋白质工程的主要研究方法

（一）蛋白质组成及结构测定方法

1. 蛋白质氨基酸序列测定方法

（1）Edman 降解法　用于测定从 N-末端开始的氨基酸序列，其基本原理是通过偶联、裂解和转化三步反应完成测定。

① 偶联：在 pH8～9 条件下，多肽链 N-末端氨基酸的氨基与异硫氰酸苯酯（PITC）试剂偶联，生成苯异硫甲氨酰基多肽（PTC-肽）。

② 裂解：在无水、强酸条件下，与 PTC 相联的氨基酸环化、肽键断裂，形成苯氨基噻唑啉酮氨基酸（ATZ-氨基酸）和一个减少了 1 个氨基酸的新肽链，此新肽链仍具有 N-末端游离氨基。

③ 转化：ATZ-氨基酸不稳定，在三氟乙酸水溶液中可转化成稳定的乙内酰苯硫脲氨基酸（PTH-氨基酸），再用薄层色谱、气相色谱、HPLC 及质谱等方法进行分析。

（2）由 cDNA 序列推导出氨基酸序列

2. 蛋白质结晶和晶体生长技术

晶体学的技术在确定蛋白质结构方面有了很大发展，但是最明显的不足是需要分离出足够量的纯蛋白质（几毫克至几十毫克），制备出单晶体，然后再进行繁杂的数据收集、计算和分析。

另外，蛋白质的晶体状态与自然状态也不尽相同，在分析的时候要考虑到这个问题。核磁共振技术可以分析液态下的肽链结构，这种方法绕过了结晶、X射线衍射成像分析等难点，直接分析自然状态下的蛋白质的结构。现代核磁共振技术已经从一维发展到三维，在计算机的辅助下，可以有效地分析并直接模拟出蛋白质的空间结构、蛋白质与辅基和底物结合的情况以及酶催化的动态机理。从某种意义上讲，核磁共振可以更有效地分析蛋白质的突变。国外有许多研究机构正在致力于研究蛋白质与核酸、酶抑制剂与蛋白质的结合情况，以开发具有高度专一性的药用蛋白质。

3. 蛋白质立体结构测定方法：X射线晶体衍射；核磁共振

(1) X射线晶体衍射　X射线又称伦琴射线，其波长为0.01～10nm。晶体结构分析用X射线的波长为0.1nm，与分子中原子的距离相当。

衍射指光线通过光栅后其传播方向发生改变的物理现象。

晶体是一种衍射光栅，其特点是内部高度的有序性。

(2) 核磁共振　目前唯一能够用来测定蛋白质溶液三维结构的方法。截止2001年4月，PDB中已有2293个蛋白质溶液三维结构。

(二) 蛋白质理化性质

蛋白质是由氨基酸组成的大分子化合物，其理化性质一部分与氨基酸相似，如两性电离、等电点、呈色反应、成盐反应等，也有一部分又不同于氨基酸，如高分子量、胶体性、变性等。

1. 蛋白质的胶体性质

蛋白质是高分子化合物，分子量比较大，其分子的大小已达到胶粒1～100nm范围之内。在水溶液中呈胶体溶液，具有丁达尔现象、布朗运动、不能透过半透膜、扩散速度减慢、黏度大等特征。蛋白质分子表面含有很多亲水基团，如氨基、羧基、羟基、巯基、酰胺基等，能与水分子形成水化层，把蛋白质分子颗粒分隔开来，阻止蛋白质颗粒的相互聚集。水化层的外围，还可有被带相反电荷的离子所包围形成双电层，这些因素都是防止蛋白质颗粒的互相聚

沉，促使蛋白质成为稳定胶体溶液。

另外，蛋白质分子扩散速度慢，黏度大，不易透过半透膜，这个特点在生物学上有重要意义，它能使各种蛋白质分别存在于细胞内外不同的部位，对维持细胞内外水和电解质分布的平衡、物质代谢的调节都起着非常重要的作用。在分离提纯蛋白质过程中，将盐类等小分子杂质用半透膜透析的办法进行去除。利用蛋白质不能透过半透膜的特性，将含有小分子杂质的蛋白质溶液放入半透膜袋内，然后将袋浸于蒸馏水中，小分子物质由袋内移至袋外水中，蛋白质仍留在袋内，这种方法叫做透析。透析是纯化蛋白质的方法之一。

2. 蛋白质的两性电离和等电点

蛋白质是由氨基酸组成的，和氨基酸一样，均是两性电解质，在溶液中可呈阳离子、阴离子或兼性离子，这取决于溶液的 pH 值、蛋白质游离基团的性质与数量。作为带电颗粒它可以在电场中移动，移动方向取决于蛋白质分子所带的电荷。蛋白质颗粒在溶液中所带的电荷，既取决于其分子组成中碱性和酸性氨基酸的含量，又受所处溶液的 pH 影响。当蛋白质在某溶液中，带有等量的正电荷和负电荷时，此溶液的 pH 值即为该蛋白质的等电点（pI）。当 pH 偏酸时，蛋白质分子带正电荷。相反，pH 偏碱，蛋白质分子带负电荷。处于等电点的蛋白质颗粒，在电场中并不移动。

各种蛋白质分子由于所含的碱性氨基酸和酸性氨基酸的数目不同，因而有各自的等电点。

凡碱性氨基酸含量较多的蛋白质，等电点就偏碱性，如组蛋白、精蛋白等。反之，凡酸性氨基酸含量较多的蛋白质，等电点就偏酸性，人体体液中许多蛋白质的等电点在 pH5.0 左右，所以在体液中以负离子形式存在。

由于各种蛋白质的等电点不同，在同一 pH 值缓冲溶液中，各蛋白质所带电荷的性质和数量不同。因此，它们在同一电场中移动方向和速度均不相同。利用这一性质来进行蛋白质的分离和分析，称为蛋白质电泳分析法。血清蛋白电泳是临床检验中最常用的项目之一。

3. 蛋白质的变性

天然蛋白质受理化因素的作用，使蛋白质的构象发生改变，导致蛋白质的理化性质和生物学特性发生变化，但并不影响蛋白质的一级结构，这种现象叫变性作用。将接近于等电点附近的蛋白质溶液加热，可使蛋白质发生凝固而沉淀。加热首先是使蛋白质变性，有规则的肽链结构被打开呈松散状不规则的结构，分子的不对称性增加，疏水基团暴露，进而凝聚成凝胶状的蛋白块。如煮熟的鸡蛋，蛋黄和蛋清都凝固。能使蛋白质变性的物理因素有加热(70～100℃)、剧烈振荡、超声波、紫外线和X射线的照射。化学因素有强酸、强碱、尿素、去污剂、重金属盐、生物碱试剂、有机溶剂等。

蛋白质的变性、沉淀与凝固相互之间有很密切的关系。但蛋白质变性后并不一定沉淀，变性蛋白质只在等电点附近才沉淀，沉淀的变性蛋白质也不一定凝固。例如，蛋白质被强酸、强碱变性后由于蛋白质颗粒带着大量电荷，故仍溶于强酸或强碱之中。但若将强碱和强酸溶液的pH调节到等电点，则变性蛋白质凝集成絮状沉淀物，若将此絮状物加热，则分子间相互盘缠而变成较为坚固的凝块。

4. 蛋白质的沉淀

在外界条件的作用下，蛋白质分子凝聚从溶液中以固体状态析出的现象称为蛋白质的沉淀。蛋白质所形成的亲水胶体颗粒具有两种稳定因素，即颗粒表面的水化层和电荷。若无外加条件，不致互相凝集。如果这时再加入某种脱水剂，除去蛋白质分子的水化膜，则蛋白质分子就会互相凝聚而析出沉淀；反之，若先使蛋白质脱水，然后再调节pH到等电点，也同样可使蛋白质沉淀析出。它的作用机制主要是破坏了水化膜或中和蛋白质所带的电荷。沉淀出来的蛋白质，根据实验条件，可以是变性或不变性。

引起蛋白质沉淀的主要方法有下述几种。

(1) 盐析 (salting out)　在蛋白质溶液中加入大量的中性盐以破坏蛋白质的胶体稳定性而使其析出，这种方法称为盐析。它的

机制是高浓度的盐溶液中的异性离子中和蛋白质颗粒的表面电荷，从而破坏蛋白质颗粒表面的水化层，失去蛋白质胶体溶液的稳定因素，降低溶解度，使蛋白质从水溶液中沉淀出来。常用的中式盐有硫酸铵、硫酸钠、氯化钠等。盐析时，若把溶液 pH 值调节至该蛋白质的等电点，则沉淀效果更好。盐析所得蛋白质加水稀释后可以重新溶解。根据各种蛋白质的颗粒大小、亲水性的程度不同，在盐析时需要盐的浓度也不一致。因此，调节中式盐的浓度，可使蛋白溶液中的几种蛋白质分段析出，这种方法称分段盐析法。临床检验中常用此法来分离和纯化蛋白质。

（2）重金属盐沉淀蛋白质　蛋白质可以与重金属离子如汞、铅、铜、银等结合成盐沉淀，沉淀的条件以 pH 稍大于等电点为宜。因为此时蛋白质分子有较多的负离子易与重金属离子结合成盐。重金属沉淀的蛋白质常是变性的，但若在低温条件下，并控制重金属离子浓度，也可用于分离制备不变性的蛋白质。

临床上常用蛋清或牛乳解救误服重金属盐的病人，目的是使重金属离子与蛋白质结合而沉淀，阻止重金属离子的吸收。然后，用洗胃或催吐的方法，将重金属离子的蛋白质盐从胃内清除出去，也可用导泻药将毒物从肠管排出。

（3）某些酸类沉淀蛋白质　蛋白质又可与生物碱试剂（如苦味酸、钨酸、鞣酸）以及某些酸（如三氯醋酸、过氯酸、硝酸）结合成不溶性的盐沉淀，沉淀的条件应当是 pH 值小于等电点，这样蛋白质带正电荷易于与酸根负离子结合成盐。

临床血液化学分析时常利用此原理除去血液中的蛋白质，此类沉淀反应也可用于检验尿中蛋白质。

（4）有机溶剂沉淀蛋白质　乙醇溶液、甲醇、丙酮等有机溶剂可破坏蛋白质的水化层，因此，能发生沉淀反应。在常温下，有机溶剂沉淀蛋白质往往引起变性。例如乙醇溶液作为消毒剂，作用机制是使细菌内的蛋白质发生变性沉淀，而起到杀菌作用。但若在低温条件下，则变性进行较缓慢，可用于分离制备各种血浆蛋白质。此法优于盐析，因不需透析去盐，而且有机溶剂很易通过蒸发去

除。如把溶液的 pH 值调节到该蛋白质的等电点时，则沉淀更加完善。

5. 蛋白质的呈色反应

（1）茚三酮反应（ninhydrin reaction） α-氨基酸与水化茚三酮（苯丙环三酮戊烃）作用时，产生蓝色反应，由于蛋白质是由许多 α-氨基酸组成的，所以也呈此颜色反应。

（2）双缩脲反应（biuret reaction） 双缩脲由两分子尿素加热缩合而成，双缩脲在碱性条件下与硫酸铜发生紫红色反应。蛋白质分子中含有许多和双缩脲结构相似的肽键，因此，也能发生类似反应，呈紫红色，对 540nm 波长的光有最大吸收峰，通常用此反应来鉴定蛋白质和定量测定。

（3）福林（Folin）反应（酚试剂反应） 蛋白质分子中含有一定量的酪氨酸残基，其中的酚基在碱性条件下与酚试剂的磷钼酸及磷钨酸还原成蓝色化合物，根据颜色的深浅可作为蛋白质的定量测定，其反应的灵敏度比双缩脲反应高 100 倍。

（4）米伦反应（Millon reaction） 蛋白质溶液中加入米伦试剂（亚硝酸汞、硝酸汞及硝酸的混合液），蛋白质首先沉淀，加热则变为红色沉淀，此为酪氨酸的酚核所特有的反应，因此含有酪氨酸的蛋白质均呈米伦反应。

此外，蛋白质溶液还可与酚试剂、乙醛酸试剂、浓硝酸等发生颜色反应。

（三）蛋白质的种类和功能

蛋白质广泛存在于各种生物组织细胞中，是生物细胞最重要的组成物质。自然界中蛋白质种类繁多，已发现的蛋白质有数万种。根据蛋白质分子的形状，可分为球蛋白和纤维蛋白。根据蛋白质分子组成繁简，可分为简单蛋白质和结合蛋白。结合蛋白分子由简单蛋白与非蛋白物质结合而成，如血红蛋白、糖蛋白、脂蛋白和核蛋白和核蛋白等。

蛋白质是生命活动的物质基础，生命活动几乎都是通过蛋白质实现的，有的蛋白质在生物体内是结构物质，有的蛋白质在生物体

内是功能物质。人和高等动物的肌肉收缩和舒张过程是由许多种蛋白质协同作用的结果；促进和决定生物体内化学反应的酶，调节生理系列化活动的某些激素也是蛋白质；血液中输送氧的血红蛋白、防御病菌感染的免疫球蛋白等也都是蛋白质。蛋白质的生物学特性是指它的生理功能，如催化、运输物质、调节物质代谢、控制核酸代谢及防御功能等。

在临床检验方面，蛋白质的生物学特性是指蛋白质的抗原性。将异种蛋白注入动物体内，经一定时间后，该动物能产生相应的抗体。这种反应的特异性很高。对不同种属的同一理化性质的蛋白质，注入体内可产生不同的抗体，称为蛋白质的种属特异性。同一种动物各组织中的蛋白质抗原性也不相同，免疫动物也可产生不同的抗体，称为蛋白质的组织特异性。利用蛋白质的抗原性，通过免疫反应来测定蛋白质，具有灵敏度高、特异性强的优点，是今后临床发展的方向。

（四）蛋白质的分子设计方法

1. 以天然蛋白质结构为依据进行分子设计

蛋白质是由不同氨基酸按一定顺序通过肽键连接而成的肽构成的。氨基酸序列就是蛋白质的一级结构，它决定着蛋白质的空间结构和生物功能。因此，可以通过改变 DNA 序列的设计方法，改变蛋白质的氨基酸序列，实现蛋白质的结构设计。通过对天然的蛋白质结构进行模拟分析，确定基因序列或氨基酸序列与蛋白质功能之间的关系。采用点突变，碱基对的缺失、插入或替代等方法，对天然蛋白质的结构进行设计，经过基因工程手段表达突变型蛋白质，研究其生物学功能。

2. 全新蛋白质分子设计

蛋白质的分子设计主要采用以下两种方法。

（1）蛋白质融合　将编码一种蛋白质的部分基因移植到另一种蛋白质基因上或将不同蛋白质基因的片段组合在一起，经基因克隆和表达，产生出新的融合蛋白质。这种方法可以将不同蛋白质的特性集中在一种蛋白质上，显著地改变蛋白质的特性。现在研究的较

多的所谓“嵌合抗体”和“人源化抗体”等，就是采用的这种方法。

（2）PCR 技术　DNA 聚合酶链式反应是应用最广泛的基因扩增技术。以研究基因为模板，用人工合成的寡核苷酸（含有一个或几个非互补的碱基）为引物，直接进行基因扩增反应，合成新的基因，表达新的蛋白质。

四、蛋白质工程的应用

（一）提高蛋白质的稳定性

有些天然蛋白质，在自然生理条件下半衰期很短。若想将其应用到实际中去，一定要延长半衰期的时间。例如，干扰素 α 是治疗慢性乙型肝炎或慢性丙型肝炎的首选治疗，可以有效地抑制或清除病毒，疗效持久，阻止肝硬化或肝癌的发生。但普通干扰素治疗具有自身不可克服的缺点，半衰期短，只有 4 个小时。为了使其能在临床上得到应用，我国科学家采取蛋白质工程的方法，将人血清白蛋白基因与其连接，表达融合蛋白，延长其半衰期，成为第三代干扰素。葡萄糖异构酶是一种在工业上广泛应用的蛋白酶，但天然的酶热稳定性差。为提高其热稳定性，朱国萍等人在确定第 138 位甘氨酸（Gly138）为目标氨基酸后，用双引物法对 GI 基因进行体外定点诱变，以脯氨酸（Pro138）替代 Gly138，含突变体的重组质粒在大肠杆菌中表达，结果突变型 GI 比野生型的热半衰期长一倍；最适反应温度提高 10～12℃；酶比活相同。这是由于用 Pro138 替代 Gly138 后，可能由于引入了一个吡咯环，该侧链刚好能够填充于 Gly138 附近的空洞，使蛋白质空间结构更具刚性，从而提高了该酶的热稳定性。

（二）生物导弹

蓖麻毒蛋白是蓖麻种子中的一种蛋白。经研究表明，蓖麻毒蛋白对肿瘤细胞有较强的杀伤作用，但由于哺乳动物的有核细胞表面均存在末端为半乳糖的配体，这种配体使该蛋白失去靶向作用引起正常细胞损伤，副作用大，从而限制其应用。人肿瘤坏死因子是一种特异性抑制肿瘤细胞的细胞因子，能够特异识别肿瘤细胞，因

此，将蓖麻毒蛋白与人肿瘤坏死因子采用蛋白质工程技术进行融合，达到特异性杀伤肿瘤细胞，而不损害正常细胞，即生物导弹，降低其对生物体的毒副作用，使之能安全应用在临床上。

（三）嵌合抗体和人源化抗体

免疫球蛋白呈Y型，由二条重链和二条轻链通过二硫键相互连接而构成。每条链可分为可变区（N-端）和恒定区（C-端），抗原的吸附位点在可变区，细胞毒素或其他功能因子的吸附位点在恒定区。每个可变区中有三个部分在氨基酸序列上是高度变化，在三维结构上是处在β折叠端头的松散结构（CDR），是抗原的结合位点，其余部分为CDR的支持结构。不同种属的CDR结构是保守的，这样就可以通过蛋白质工程对抗体进行改造。

鼠单克隆抗体被人免疫系统排斥，它潜在的治疗作用得不到利用。嵌合抗体就是用人抗体的恒定区替代鼠单克隆抗体的恒定区，这样它的免疫原性就显著下降。如用于治疗直肠结肠腺癌的单克隆抗体Mab17-1A。尽管嵌合抗体还存在着免疫原的问题，但仍有几种嵌合抗体通过了临床实验。所谓人缘化抗体就是将抗原吸附区域嫁接到人抗体上，这样抗体上的外源肽链降低到最小，免疫原性也就最小。但是，仅将CDR转接到人抗体上，其抗原吸附能力很小，必须带上几个框架氨基酸残基，才能保持原有的吸附力。这样就存在免疫原性与抗原吸附力之间的矛盾。通过逐个氨基酸替代或计算机模拟分析，可在保持原有吸附力的基础之上，尽可能地降低免疫原性。第一个临床上应用的用于治疗淋巴肉芽肿病和风湿性关节炎的人缘化抗体CAMPATH-1H，尽管疗效显著，但仍有半数以上的患者有免疫反应。而其他人缘化抗体如治疗脊髓性白血病的ANTI-CD33等，其免疫反应可以忽略不计。

除此之外，蛋白质工程在进行水蛭素、生长激素、胰岛素的改造方面正在显示出独有的作用。

蛋白质工程的发展很快，研究工作很多，以上仅介绍了几个例子。蛋白质工程除了用于改造天然蛋白质或设计制造新的蛋白质外，其本身还是研究蛋白质结构功能的一种强有力的工具，它在解

决生物理论方面所起的作用，可以和任何重大的生物研究方法相提并论。

五、蛋白质工程进展

当前，蛋白质工程是发展较好、较快的分子工程。这是因为在进行蛋白质分子设计后，已可应用高效的基因工程来进行蛋白的合成。最早的蛋白工程是福什特等在1982～1985年间对酪氨酰—tRNA合成酶的分子改造工作。他根据XRD（X射线衍射）实测该酶与底物结合部位结构，用定位突变技术改变与底物结合的氨基酸残基，并用动力学方法测量所得变体酶的活性，深入探讨了酶与底物的作用机制。佩里（Perry）1984年通过将溶菌酶中Ile（3）改成Cys（3），并进一步氧化生成Cys（3）—Cys（97）二硫键，使酶热稳定性提高，显著改进了这种食品工业用酶的应用价值。1987年福什特通过将枯草杆菌蛋白酶分子表面的Asp（99）和Glu（156）改成Lys，而导致了活性中心His（64）质子pK_a从7下降到6，使酶在pH=6时的活力提高10倍。蛋白工程还可对酶的催化活性、底物专一性、抗氧化性、热变性、碱变性等加以改变。由此可以看出蛋白工程的威力及其光辉前景。

蛋白质工程汇集了当代分子生物学等学科的一些前沿领域的最新成就，它把核酸与蛋白质结合、蛋白质空间结构与生物功能结合起来研究。蛋白质工程将蛋白质与酶的研究推进到崭新的时代，为蛋白质和酶在工业、农业和医药方面的应用开拓了诱人的前景。蛋白质工程开创了按照人类意愿改造、创造符合人类需要的蛋白质的新时期。

第二节　酶　工　程

人们早就知道，在催化化学方面，就其经济性、效率以及用途的多样性而言，很难有其他的化学物质能超过生物酶。如今，生物酶已被广泛用于人类生活的许多方面，如食品、饮料、医用药品、化学工业及洗涤剂的生产等。

酶工程主要研究酶的生产、纯化、固定化技术、酶分子结构的

修饰和改造以及在工农业、医药卫生和理论研究等方面的应用。酶工程主要采用两种方法。一是化学酶工程，即通过对酶的化学修饰或固定化处理，改善酶的性质以提高酶的效率和减低成本，甚至通过化学合成法制造人工酶；另一种是生物酶工程，即用基因重组技术生产酶以及对酶基因进行修饰或设计新基因，从而生产性能稳定，具有新的生物活性及催化效率更高的酶。因此酶工程可以说是把酶学基本原理与化学工程技术及重组技术有机结合而形成的新型应用技术。

一、化学酶工程

化学酶工程也可称为初级酶工程，是指天然酶、化学修饰酶、固定化酶及人工模拟酶的研究与应用。

（一）天然酶

早期，工业用酶制剂大多是通过微生物发酵、提取而获得的，应用方式简单，产品种类少，使用范围窄，例如洗涤剂、皮革、纸张制造等。现在，天然酶的分离纯化及应用随着生物技术的发展，得到长足的发展，目前医药及科研用酶多数是从生物材料中分离纯化得到的。

（二）化学修饰酶

为了提高天然酶的性能，可以通过对酶分子的化学修饰改善酶的活性，以适用于各种不同的需求。化学修饰的途径多种多样，既可以通过对酶分子表面进行修饰，也可对酶分子内部进行修饰。修饰的主要方法有：①酶功能基修饰；②交联反应；③大分子修饰。

（三）固定化酶

用物理或化学方法处理水溶性的酶使之变成不溶于水或固定于固相载体的但仍具有酶活性的酶衍生物被称为酶的固定化。在催化反应中，固定化酶以固相状态作用于底物，反应完成后，容易与水溶性反应物分离，可反复使用。它不但仍具有酶的高度专一性和高催化效率的特点，且比水溶性酶稳定，可较长期使用，具有较高的经济效益。

酶的固定化方法简述如下。

（1）载体结合法　最常用的是共价结合法，即酶蛋白的非必需基团通过共价键和载体形成不可逆的连接。正常情况下，能发生偶联的蛋白质基团包括氨基、羧基、半胱氨酸的巯基、酪氨酸的酚基、丝氨酸和苏氨酸的羟基。这些参与和载体共价结合的基团，不能是酶表现活力所必需的基团。

（2）交联法　某些双功能团试剂能使酶分子之间发生交联凝集成网状结构，使之不溶于水从而形成固定化酶。常采用的双功能团试剂有戊二醛、顺丁烯二酸酐等。

（3）包埋法　包埋法是利用聚合物凝胶或半适性高聚物，将酶包埋于胶网格或微胶囊中的方法。包埋法制备固定化酶除包埋水溶性酶外还常包埋细胞，制成固定化细胞，例如可用明胶及戊二醛包埋具有青霉素酰化酶活力的菌体，工业上用于生产 6-氨基青霉烷酸。

酶经过固定化后，比较能耐受温度及 pH 的变化，对底物专一性没有任何改变，实际使用效率得到大大提高。

（四）人工模拟酶

在深入了解酶的结构与功能以及催化作用的机制的基础上，近 10 年来，有许多科学家模拟酶的生物催化功能，用化学半合成法或化学全合成法合成了人工酶催化剂。

二、生物酶工程

DNA 重组技术问世以来，把酶学推进到一个十分重要的发展时期。生物酶工程是在化学酶工程基础上发展起来的一门科学，是以酶学和 DNA 重组技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物。

生物酶工程主要通过以下三个方面来实现：①用 DNA 重组技术大量地表达、生产目的酶；②对酶基因进行修饰；③设计新的酶基因，合成自然界不曾有过的、性能稳定、催化效率更高的新酶。

酶基因的克隆和表达技术的应用使我们有可能克隆各种天然的蛋白基因或酶基因。先在特定的酶的结构基因前加上高效的启动基因序列和必要的调控序列，再将此片段克隆到一定的载体中，然后

将带有特定酶基因的上述杂交表达载体转化到适当的受体细菌中，经培养繁殖，再从收集的菌体中分离得到大量的表达产物——所需要的酶。

近几年兴起的另一个新研究领域：酶的选择性遗传修饰，即酶基因的定点突变。研究者们在分析氨基酸序列弄清酶的一级结构及X射线衍射分析弄清酶的空间结构的基础上，再在由功能推知结构或由结构推知功能的反复推敲下，设计出酶基因的改造方案，确定选择性遗传修饰的修饰位点。

现在人们已掌握技术，所以只要有遗传设计蓝图，就能人工合成出所设计的酶基因。酶遗传设计的主要目的是创制优质酶，用于生产昂贵特殊的药品和超自然的生物制品，以满足人类的特殊需要。

需要改善的酶学性质包括：对热、氧化剂、非水溶剂的稳定性；对蛋白水解作用的敏感性；免疫原性；最适pH、离子强度及温度；催化效率；对底物和辅助因子的专一性与亲和力；反应的主体化学选择性；催化效率；别构效应；反馈抑制；多功能性；在纯化或固定化过程中酶的功能和理化性质等。

第八章　发酵工程

酿酒在我国有着悠久的历史，早在先秦时期，在宫中就设置了主管酿酒的官职，说明酿酒已成为专门的职业。我国古代人民以大米、小麦等酿出甘醇可口的美酒，用谷物酿造酒其实质是发酵生产酒精的过程。同时埃及人已掌握了烘制面包、酿果酒的技术。发酵业虽然历史悠久，但在科学技术普遍受压抑的时代里，只能处于低水平的应用阶段，人们普遍认为各种发酵产物是自然产生的。

到了17世纪，随着自然科学的诞生和发展，人们对自然的认知水平得到了大幅度的提高，给发酵业的发展带来了契机。19世纪的早期，法国的科学家巴斯德提出了“一切发酵过程都是微生物作用的结果，是生命过程”的理论，使发酵业在深度和广度上不断得到发展，并与工程学结合形成了一门新兴的工程——微生物发酵工程。

20世纪初，发酵工程又经历了几次重大的转折，不断地发展和完善。20世纪40年代初，随着青霉素的发现，抗生素发酵工业逐渐兴起。由于青霉素产生菌是需氧型的，微生物学家就在厌氧发酵技术的基础上，成功地引进了通气搅拌和一整套无菌技术，建立了深层通气发酵技术。它大大促进了发酵工业的发展，使有机酸、维生素、激素等都可以用发酵法大规模生产，如今20种氨基酸都可用发酵法生产。氨基酸发酵工业的发展，是建立在代谢控制发酵新技术的基础上的。科学家在深入研究微生物代谢途径的基础上，通过对微生物进行人工诱变，得到适合于生产某种产品的突变类型，再在人工控制的条件下培养，大量生产出人们所需要的物质。

自20世纪70年代以来，基因工程、细胞工程、酶工程、生化工程等新技术的发展给发酵工程学科注入了新的活力，使发酵工程

进入了定向育种的新阶段，新产品层出不穷，为解决人类所面临的食品与营养、健康与环境、资源与能源等重大问题开辟了新的途径。80 年代以来，随着学科之间的不断交叉和渗透，微生物学家开始用数学、动力学、化学工程原理、计算机技术对发酵过程进行综合研究，使得对发酵过程的控制更为合理。在发酵过程中，通过自动记录和自动控制发酵过程的全部参数，明显提高了生产效率。发酵工业的各类产品已广泛应用于医药、轻工、食品、能源、环境等领域中。发酵工程必将为我国国民经济的发展做出更大的贡献。

发酵工程是利用生物的特定性状，通过现代工程技术手段产生有用物质或直接应用于工业化生产，将生物资源开发、医药制品、能源、环境保护等方面联系起来的一种技术体系，是将传统发酵技术与微生物学、化学和生物化学有机结合并发展起来的现代化技术。

发酵工程是一种旨在利用发酵手段大量培养细胞和生产代谢产物，根据不同的要求，通过人工培养去诱发各种类型的发酵，获得所需的发酵产品的工艺技术。

第一节　生产中常用菌种的分离、选育和保藏

在发酵工程中，菌种、发酵工艺和产物的分离是决定发酵生产水平的主要因素。其中，优良高产菌种的分离选育最为关键，因为一个优质高产的菌株，不仅为发酵提供了物质基础，还可以通过改善其自身生物学特性，提供各种类型的性状优良的突变株，提高产品质量，降低经济成本。最初，人们是从自然界寻找所需要的菌种的，但用这种方法得到的菌种，产量一般都比较低，不能满足工业上的需要。

20 世纪 40 年代，微生物学家开始用人工诱变的方法进行育种，就是用紫外线、化学诱变剂等处理菌种，使菌种产生突变，再从中筛选出符合要求的优良菌种。这种育种方法已在氨基酸、核苷酸、某些抗生素等的发酵生产中获得成功。例如，刚开始生产青霉素时，青霉素的产量只有 20μg/mL 左右，经过长期的诱变育种，

如今青霉素的产量已达到85000μg/mL以上。

随着生物技术的发展，生物学家开始用细胞工程、基因工程等方法，构建工程细胞或工程菌，再用它们进行发酵，就能生产出一般微生物所不能生产的产品。

一、菌种的分离

发酵过程中，根据不同的目的，采用不同的菌株。这些菌株最初都是从自然界中分离出来，在它们体内目的产物一般都很低。因此，需要对其进行进一步的分离纯化，甚至采用诱变育种的方法，使其体内目的产物能够大量积累，符合工业生产的要求。

（一）菌种的来源

从大自然中分离筛选新的微生物菌种，根据资料直接向科研单位、高等院校、工厂或菌种保藏部门索取或购买。

（二）菌种的分离

1. 菌种的采集

新菌种的分离是要从混杂的各类微生物中依照生产的要求、菌种的特性，采用各种筛选方法，快速、准确地把所需要的菌种挑选出来。

以采集土壤为例，一般园田土和耕作过的沼泽土中，以细菌和放线菌为主，富含碳水化合物的土壤和沼泽地中，酵母和霉菌较多。采样的对象也可以是植物，腐败物品，某些水域等。采样季节以温度适中，雨量不多的秋初为好。在选好适当地点后，用小铲子除去表土，取离地面5～15cm处的土约10g，盛入清洁的牛皮纸袋或塑料袋中，扎好，标记，记录采样时间、地点、环境条件等，以备查考。为了从一特定生态系统中分离出具有代表性的细菌菌群，特别是分离那些在唯一微环境区域中出现的菌群时，必须十分重视样本的采集。

实验室或生产用菌种若不慎污染了杂菌，也必须重新进行分离纯化。

2. 菌种的分离、筛选

从自然界中分离培养微生物是菌种选育的重要基础。到目前为

止，还没有一种分离培养方法能揭示一个试样中所包含的所有微生物总数和种类。在微生物筛选过程中，应及时调整检测方法，以与各种不同类型的生长和代谢之微生物相适应。纯种分离的方法有划线分离法、稀释分离法。

3. 菌种增殖

为了容易分离到所需的菌种，人为地通过控制养分或培养条件，让无关的微生物至少是在数量上不要增加，可以通过配制选择性培养基，选择一定的培养条件来控制。

例如碳源利用的控制，可选定糖、淀粉、纤维素、或者石油等，以其中的一种为唯一碳源，那么只有利用这一碳源的微生物才能大量正常生长，而其他微生物就可能死亡或淘汰。这样下阶段的纯种分离就会顺利得多。

4. 生产性能测定

进行生产性能测定，包括形态、培养特征、生理生化特性、发酵周期、产量、耐受温度、生长和发酵最适温度、最适 pH 值、提取工艺等。

5. 毒性试验

自然界的一些微生物是在一定条件下产毒的，将其作为生产菌种应当十分当心，尤其与食品工业有关的菌种，更应慎重。据有的国家规定，微生物中除啤酒酵母、黑曲霉、米曲霉和枯草杆菌作为食用无需作毒性试验外，其他微生物作为食用，均需通过两年以上的毒性试验。

二、菌种的选育

菌种的选育是运用遗传学原理和技术对某个用于特定生物技术目的的菌株进行的多方位的改造。通过改造，可使现存的优良性状得以强化，去除不良性质或增加新的性状。主要方法包括诱变育种、基因工程育种等。

（一）诱变育种

微生物在自然状态下的变异概率很低，一个基因的自然突变频率仅 10^{-6}～10^{-10}左右。为了获得较多的突变个体，以诱发突变为

基础的育种，是迄今为止国内外用来提高菌种产量、性能的主要手段。诱变育种主要包括物理诱变和化学诱变两种方法。

1. 诱变剂和诱变处理

物理诱变中目前使用得最方便而且十分有效的是紫外线。许多高产菌株的选育都用过紫外线，相对来讲，该方法比较安全，适用于一般实验室、工厂。其他的几种射线，X 射线、γ 射线等，有一定的穿透力，有一定危险性，一般都必须由专业人员在专门的设备中使用。

化学诱变剂包括碱基类似物、5-氟尿嘧啶、烷化剂等。化学诱变剂中使用最多、最有效的是烷化剂。大多数情况下，就突变数量而言，化学诱变要比电离辐射更有效。而且化学诱变剂很经济，因为只需要少量的合适的诱变剂，对实验设备要求也比较简单。

大部分诱变剂是致癌剂，所以在使用中必须非常谨慎，要避免化学诱变剂与皮肤接触，且切勿吸入其蒸气，有人对某些诱变剂极其敏感，必须十分当心。

2. 诱变育种步骤

(1) 原始菌株的选择

① 自然界新分离的野生型菌株，对诱变处理较敏感，容易达到好的效果。

② 在生产中经生产选种得到的菌株与野生型较相像，也是良好的出发菌株。

③ 每次诱变处理都有一定提高的菌株，往往多次诱变能积累较多的提高。

④ 原始菌株开始时可以同时选 2～3 株，在处理比较后，将更适合的出发菌株留作继续诱变。

⑤ 根据细胞生理状态或诱变谱选择不同的诱变剂与诱变方法，因为同一诱变剂的重复处理会使细胞产生抗性，使诱变效果下降。

(2) 处理菌悬液的制备　用合适的培养基进行培养后，经离心，洗涤，过滤，制备单细胞和单孢子状态的、活力类似的菌悬液。这一过程在诱变育种中比较重要。

3. 诱变处理

(1) 紫外线诱变　通常采用 15W，波长为 253.7nm 的紫外线杀菌灯。灯与处理物的距离为 15～30cm，照射时间依菌种而异，一般为几秒至几十分钟。照射剂量死亡率控制在 70%～80%为宜。被照射的菌悬液细胞数，细菌为 10^6 个/mL 左右，霉菌孢子和酵母细胞为 10^6～10^7 个/mL。由于紫外线穿透力不强，照射液时要进行搅拌，使照射均匀。由于紫外线照射后有光复活效应，所以照射时和照射后的处理应在红灯下进行。其操作步骤如下。

① 以 3000r/min 离心 5min 收集细菌培养物，弃去上清液，将菌体用无菌生理盐水离心洗涤，重悬作为待处理菌悬液。

② 取 2～4mL 制备的菌液加到直径 9cm 培养皿内，放在 15W 紫外线下 30cm 处，开启皿盖正式在搅拌下照射 10～50s。操作均应在红灯下进行。

③ 计数活菌细胞数。

④ 取中间培养液稀释分离、培养。

(2) 化学诱变

① 单孢子悬液制备同上所述。

② 诱变处理　吸取化学诱变剂溶液，加入到细菌悬液中，30℃振荡 30min，立即稀释 1000 倍停止作用，然后稀释培养，计数。

4. 中间培养

诱变处理后的菌液需要在液体培养基中培养几个小时后再进行下一步操作，让细胞内的遗传物质复制，让细胞繁殖几代，以便得到纯的变异细胞。这个过程对今后的筛选和获得稳定菌株都是极为重要的。若不经中间培养，直接在平皿上分离就会出现变异和不变异细胞同时存在于一个菌落内的可能，形成混杂菌落，以致造成筛选结果的不稳定和将来的菌株退化。

5. 分离和筛选

首先以迅速筛出大量的达到初步要求的分离菌落为目的进行初筛，以量为主。然后再以精选为目的，进行重复筛选得到优秀菌

株。在以后的复筛阶段，还应不断结合自然分离，纯化菌株。

（二）基因工程育种

基因工程育种是运用各种 DNA 体外操作技术，将目的基因转移至新的宿主细胞并使其在新的宿主细胞系统内进行复制和表达，或者通过细胞间的相互作用，使一个细胞的优秀性状经其间遗传物质的交换而转移给另一个细胞的方法。

（三）杂交育种

细菌杂交实现的种类尚不多，主要是大肠杆菌，其他还有鼠伤寒沙门菌、铜绿假单胞菌、淋病奈氏球菌等。

酵母杂交育种运用酵母的单双倍生活周期，将不同基因型和相对的交配型的单倍体细胞经诱导杂交而形成二倍体细胞，经筛选便可获得新的遗传性状。主要有孢子杂交法、群体交配法、单倍体细胞杂交法等。

（四）原生质体育种

原生质体育种技术主要有原生质体融合、原生质体转化技术，此外尚有原生质体诱变育种等。

三、微生物菌种的保藏与复苏

在生产发酵中，能够生产某种具有重要经济价值的代谢产物的微生物菌种的保存和长期保藏，对于发酵过程极为重要。

（一）微生物菌种保藏

微生物菌种的保藏有许多种形式，主要有四种形式：①冷冻干燥或真空干燥保藏；②超低温或在液氮中冷冻保藏；③转接培养或斜面传代保藏；④土壤或陶瓷珠等载体干燥保藏。

其中冷冻保藏为保藏微生物菌种的最简单而有效的方法。通过冷冻，使微生物代谢活动停止，冷冻温度愈低，效果愈好。为了获得满意的冷冻结果，通常应在培养物中加入一定的冷冻保护剂。冷冻保藏时温度要求在－20℃以下。冷冻深藏的缺点之一是培养物运输较困难。

冷冻保藏种类：普通冷冻保藏（－20℃）；超低温冷冻保藏

(－80～－60℃)；液氮冷冻保藏和冻干保藏。其中冷冻干燥的方法是通过在减压条件下使冻结的细胞悬液中的水分升华，使培养物干燥，此法是微生物菌种长期保藏的最为有效的方法之一。

大部分微生物菌种可以在冻干状态下保藏 10 年之久而不丧失活力。而且经冻干后的菌株无需进行冷冻保藏，便于运输。

（二）复苏

1. 冷冻保藏的菌种复苏程序

① 从液氮罐中取出所需的安瓿，立即置于冰浴中。

② 迅速将安瓿置于 37～40℃水浴中，并轻轻摇动以加速溶解。

③ 用巴氏吸管将安瓿中储存培养物移接入含有 2mL 无菌液体培养基的试管中，用同一支吸管反复抽吸数次，然后取 0.1～0.2mL（约 4～8 滴）转接入琼脂斜面上。

2. 冻干菌种的复苏

① 在超净工作台中用 70%酒精棉球擦洗安瓿，然后用砂轮在安瓿中锉一道沟。

② 用无菌纱布或无菌毛巾包好安瓿，然后用手掰开安瓿。

③ 在安瓿中加入 0.5～1mL 营养液体培养基，慢慢旋转安瓿，使冻干菌种复水。然后将此转接到一含有再生培养基的无菌试管中，或直接接种琼脂斜面或涂布平板。

④ 在指管中冻干的菌种通常为絮粉状，可以将此直接振落入盛有 1～2mL 液体培养基的试管中，轻轻振荡 5～10min，然后用此悬液接种适宜的再生培养基。

第二节　发酵工艺条件的确定

发酵过程实际上是利用微生物将原料在适合的条件下经微生物特定的代谢途径转变为人类所需的物质的过程。在这个过程中，若使微生物能够极大限度产生合成所需的产物，除了菌种本身的性状外，也受许多外界条件的限制和制约。因此，为了达到人类的目的，就需要对这些条件进行研究，建立最佳的发酵工艺条件。

一、培养基的选择和确定

自然界中的微生物的营养活动，是依靠向外界分泌大量的酶，将周围环境中大分子的蛋白质、糖类、脂肪等营养物质分解成小分子化合物，再借助细胞膜的渗透作用，吸收这些小分子营养来实现的。在发酵培养过程中，微生物所需的营养条件是通过培养基来提供的。

（一）培养基的营养成分

任何类型的发酵工艺都是围绕着如何满足微生物的营养需求，更多地获得目的产物来进行的。因此，所有发酵培养基都必须提供微生物生长繁殖和产物合成所需的能源，包括碳源、氮源、无机元素、生长因子及水、氧气等。对于大规模发酵生产，除考虑上述微生物的需要外，还必须重视培养基原料的价格和来源。

1. 碳源

碳酸气；淀粉水解糖，糖蜜、亚硫酸盐纸浆废液等；石油、正构石蜡，天然气，醋酸、甲醇、乙醇等石油化工产品。

2. 氮源

豆饼或蚕蛹水解液，味精废液，玉米浆，酒糟水等有机氮，尿素，硫酸铵，氨水，硝酸盐等无机氮，气态氮。

3. 无机盐

磷酸盐，钾盐，镁盐，钙盐等其他矿盐，铁、锰、钴等微量元素。

4. 特殊生长因子

硫胺素、生物素、对氨基苯甲酸、肌醇等。

（二）培养基的分类

1. 从组成上，可以分为天然培养基、合成培养基和半合成培养基

（1）天然培养基　以各种植物和动物组织或微生物的浸出物、水解液等物质（例如牛肉膏、酵母膏、麦芽汁、蛋白胨等）为主要成分制成的。适合于各类异养微生物生长，而一般自养微生物都不能生长。

（2）合成培养基　根据生物生长需要，用化学试剂直接配制而成。该类培养基成分精确，重复性强，适用于在实验室范围做有关营养、代谢、分类鉴定、生物测定及选育菌种、遗传分析等定量研究工作，可以减少不能控制的因素。由于该培养基较天然培养基的成分简单，因此一般微生物在合成培养基上生长较慢，有些对营养要求复杂的微生物在合成培养基上不能生长。

（3）半合成培养基　现在大多数的使用的培养基是将以上两种培养基结合起来，即采用一部分天然有机物作碳源、氮源和生长因子的来源，再适当加入一些化学药品以补充无机盐成分，使其更能充分满足微生物对营养的需要。大多数微生物都能在此培养基上生长繁殖。因此，在微生物工业生产上和试验研究中被广泛使用。

2. 从形态上，培养基还被分为固体培养基和液体培养基

（1）液体培养基　发酵过程中多用液体培养基进行培养种子和发酵。根据不同微生物对氧的要求情况，分别作静止或通风搅拌培养。在菌种筛选工作和菌种培养工作中，也常用液体培养基进行摇瓶培养。

（2）固体培养基　是在液体培养基中加入琼脂等凝固剂配成的，分为斜面试管、平板等形式。固体培养基经常用在菌种的分离、保藏、菌落特征的观察、活菌计数和鉴定菌种等方面。

此外，除了以上的培养基外，还根据需要开发出了增殖培养基、鉴别培养基和选择培养基等。

（三）发酵生产中的常用的培养基类型

1. 斜面培养基

该类培养基根据所使用的对象，对培养基中营养物质的含量进行调整。例如，富含有机氮源，少含或不含糖分，有机氮有利于菌体的生长繁殖，能获得更多的细胞。对于放线菌或霉菌的产孢子培养基，则氮源和碳源均不宜太丰富，否则容易长菌丝而较少形成孢子。

2. 种子培养基

该类培养基主要用来进行菌种的扩大培养，增加细胞数量；同

时也必须培养出强壮、健康、活性高的细胞。为了使细胞迅速进行分裂或菌丝快速生长，需要完全和丰富的营养物质，与发酵培养基的主要成分相近。

3. 发酵培养基

发酵培养必须根据产物合成的特点来设计培养基，充分满足细胞生长繁殖对培养基的需求，能获得最大的产物。这种培养基不仅耗用大量的原材料，而且也是决定发酵生产成功与否的重要因素。因此，除了供给充足的碳源物质外，还添加足够的铵盐或尿素等氮素化合物，利于提高单位容积发酵罐的利用率，增加经济效益。

（四）培养基确定方法

发酵培养基的选择必须满足细胞生长，代谢活动和合成产物所需的基本要求，原料价格应该低廉，质量稳定可靠。尽量减少副产物的形成，便于产物的分离纯化，并尽可能减少产生“三废”的物质。

① 首先了解菌种的来源、生理生化特性和一般的营养要求，应根据不同类型微生物的生理特性考虑培养基的组成。

② 选择一种化学合成培养基做基础，先用摇瓶做一些试验。再进行小型发酵罐培养试验，摸索菌种对各种主要有机碳源和氮源的利用情况和生产代谢产物的能力。在培养过程中注意 pH 值变化，观察适合于菌种生长繁殖和适合于代谢产物形成的两种不同 pH 值，不断调整配比来适应上述各种情况。

③ 调整培养基配比时，每次只限一个变动条件。在合成培养基上得出一定结果后，再做复合培养基试验。最后试验各种发酵条件和培养基的关系。培养基内 pH 值可由添加碳酸钙来调节，其他如硝酸钠、硫酸铵也可用来调节。

④ 根据实际生产和科学研究的需要及经济效益选择合适的培养基。

二、发酵工艺的确定

在自然界中，不同的微生物具有不同生长环境，其各项生理生化特征都和这些环境相适应。因此，在发酵过程中，应尽量模仿这

些微生物的生存环境，对各种影响因素进行优化，极大地发挥微生物的潜能，争取最大效益。

（一）发酵条件确定

影响发酵的因素很多，如温度、pH 值、通风、搅拌、罐压力等，必须适当地控制影响发酵的各种条件，掌握发酵的动态，并进行杂菌的检查和产物测定，使整个发酵过程顺利进行。

1. 温度

任何微生物的生长都需要有最适的生长温度，在此温度范围内微生物生长繁殖最快。通常在生物学范围内每升高 10℃，微生物的生长速度就加快一倍，所以温度直接影响产物的产量。对于微生物来说，温度直接影响其生长和合成酶。尽量选择稍高一些的温度进行生长和繁殖，这对生产有很大的好处。

2. pH 值

各种微生物有其可以生长的和最适生长的 pH 范围，培养基中的 pH 值与微生物生命活动有着密切关系。发酵过程中，控制发酵液的 pH 值是控制生产的指标之一，pH 值过高、过低都会影响微生物的生长繁殖以及代谢产物的积累。控制 pH 值不但可以保证微生物良好的生长，而且可以防止杂菌的污染。

3. 氧

好氧菌主要是有氧呼吸或氧化代谢，厌氧菌为厌气发酵，兼性厌氧菌则两者兼而有之。不同微生物在依赖获得能量的代谢方面存在差异，因此对氧的需要也不同。发酵过程中通常以通气的形式供给大量的氧。通气量的多少，是按氧溶解的多少来决定。只有氧溶解的速度大于菌体的吸氧量时，菌体才能正常地生长和合成。因此随着菌体繁殖，呼吸增强，必须按菌体的吸氧量加大通气量，以增加溶解氧的量。不同微生物或同一微生物的不同生长阶段对通风量的要求也不相同。

（二）工业发酵

1. 工业发酵步骤和工艺流程

① 用作培养菌种及扩大生产的发酵罐的培养基的配制；

② 培养基、发酵罐以及辅助设备的消毒灭菌；

③ 将已培养好的有活性的纯菌株以一定量转接到发酵罐中；

④ 将接种到发酵罐中的菌株控制在最适条件下生长并形成代谢产物；

⑤ 将产物抽提并进行精制，以得到合格的产品；

⑥ 回收或处理发酵过程中产生的废物和废水。

2. 发酵原料的预处理

不同微生物发酵所需要的培养基组成原料不同，处理方法也有所差异，需根据具体组成成分而定。例如，淀粉需经酸水解或酶水解变成糊精或葡萄糖才能应用。

3. 菌种斜面培养

保存于冷冻管及砂土管或冰箱中的已有的优良生产菌种或选育的新菌种斜面菌种，在正式使用前要先转接到新鲜斜面培养基上活化后，再用于种子扩大培养。

4. 种子扩大培养

扩大培养的方法可以根据需要采用固体培养或液体培养不同方式。固体种子扩大培养一般采用传统的制曲工艺，一般先用克氏瓶或匣子瓶进行扩大，再转接到曲盘扩大培养。液体培养法包括液体试管、三角瓶摇床振荡或回旋式培养。对于好氧微生物，将克氏瓶表面培养的菌种接到装有液体培养基的三角瓶中，在摇床上振荡培养。对于厌氧微生物，将有菌种的试管斜面或克氏瓶转接到三角瓶液体培养基中静置培养。

5. 微生物发酵和控制

微生物发酵方式可分为固体发酵和液体发酵两种。固体发酵适合于传统发酵工艺及乡镇企业用来生产比较简单的产品。液体发酵适合于大规模工业化生产。

(1) 固体培养　又分为浅盘固体培养和深层固体培养。在固体培养中，氧气是由基质粒子间空隙的空气直接供给微生物，比液体培养时的用通气搅拌供给氧气节能。

(2) 液体发酵培养　液体发酵培养是从罐底部通气，送入的空

气由搅拌桨叶分散成微小气泡以促进氧的溶解而进行培养的方式。这种由罐底部通气搅拌的培养方法，又称为深层培养法。该培养的特点是容易按照生产菌种对于代谢的营养要求以及不同生理时期的通气、搅拌、温度、与培养基中氢离子浓度等条件，选择最佳培养条件。

液体发酵培养又分为放大法、两步法、控制培养法、分批发酵法、连续培养法、补料分批培养法（流加法）。

① 放大法

将微生物在摇瓶基础上逐级放大以实现大规模生产。一般从实验室规模到工厂生产要经过 3～5 级放大步骤。放大过程中应对氧传递速度、混合时间、雷诺数等几个因素进行考虑。

② 两步法

该方法的特点是将菌体生长条件与生产条件分开来。菌种先在丰富的培养基上大量繁殖，然后收集菌体浓缩物，洗涤后再转入添加诱导物的生产培养基，在此期间，菌体积累大量的产物，一般不再繁殖，从而使营养成分或诱导物得到充分利用。

③ 控制培养法

目前，大量用于露天大罐啤酒发酵采用控制培养法。根据已掌握的及可能测定的环境因子对微生物代谢活动的影响，以此为基础进行控制培养，以达到产物生成的最优培养条件。

④ 补料分批培养法（流加法）

在进行分批培养时，不断地供给培养基，只有当所需产物积累到一定量时才进行取样处理，这种培养方法称为补料分批培养法。主要用于面包酵母、氨基酸、抗生素等工业。

⑤ 连续培养法

在发酵罐中连续供给新鲜培养基的同时，也将含有微生物和产物的培养液，从发酵罐中连续收集的发酵方法叫做连续培养法。该方法能使微生物处于恒定不变的环境中进行长期持续的培养状态。该方法主要用于废水处理、葡萄糖酸发酵、酒精发酵等工业中。

6. 发酵过程中不利条件

(1) 污染的控制　在发酵培养过程中，各种各样的污染非常多，污染的原因归结起来是：设备、管道、阀门漏损、灭菌不彻底；空气净化不好；无菌操作不严或菌种不纯等。必须定期检查消毒效果，加强接种过程中的消毒管理工作，严格无菌操作技术。如果新菌种不纯，则需反复分离，直至完全纯粹为止。对于已出现杂菌菌落或噬菌斑的试管斜面菌种，应予废弃。对于菌种扩大培养的工艺条件要严格控制，对种子质量更要严格掌握，确证无杂菌存在，才能向发酵培养基中接种。

(2) 泡沫控制　培养过程中产生大量的泡沫，泡沫的存在影响着微生物对氧的吸收，妨碍二氧化碳的排出，因而破坏其生理代谢的正常进行，不利于发酵；由于泡沫大量生成，致使培养液的容量一般只能等于种子罐容量的一半左右，大大影响了设备的利用率，甚至发生跑料，招致染菌，造成巨大损失。

发酵工业常采用加消泡剂的方法来解决泡沫。各种天然的动植物油及来自石油化工生产的矿物油、改性油、表面活性剂等都可用来做消泡剂。新型的有机硅聚合物如硅油、硅树脂等具有效率高、用量省、无毒性、无代谢性，同时兼有提高微生物合成酶等多种优良特性，是一类有发展前途的消泡剂。泡沫的控制除了添加消泡剂外，改进培养基成分也是相辅相成的一个重要方面。

7. 厌氧培养

厌氧培养在发酵工业上是一种很重要的发酵形式。厌氧培养主要有以下几种形式。

(1) 厌氧罐培养法　碱性焦性没食子酸法：焦性没食子酸与 Na_2CO_3 反应可释放出 CO_2 并吸收环境中的氧。

(2) 厌氧箱培养法　厌氧培养箱由厌氧环境操作箱、恒温培养箱、高度真空传递箱、气路控制系统、箱架、瓶架等部分组成。培养箱的温度能自行调节控制，气路安排合理，能任意输入所需气体和准确调节流量。箱内备有紫外灯，可消毒操作室内空气。使用厌氧培养箱进行厌氧微生物分离培养时，整个操作过程可在正压 CO_2 或氮气下进行，使整个接种过程在无氧状态下。因此，厌氧

培养箱在分离、研究极端专性厌氧菌时更有其优势。

（3）液体培养基法　液体培养基法主要是在培养基中加入一定的还原物质并隔绝空气。常见的有庖肉培养基法、硫乙醇酸钠法、牛心脑浸液培养基法等。

此外，还有深层穿刺分离培养和深层穿刺与化学吸氧相结合等方法。

三、发酵产物的分离提取、意义

不同的发酵产物可以采用不同的方法进行收集。利用菌体时，离心沉淀或板框压滤法使菌体与醪液分开，也可以用喷雾干燥法直接做成粉剂。产物为酒精时，发酵醪蒸馏塔蒸馏。产物为抗生素及有机酸时，根据产物的不同特性，采用离子交换树脂吸附处理、脱色过滤、减压浓缩等方法提取精制。获得的产物都要按照有关部门制定的国家标准进行质量检验和性能测定，符合要求后才为合格产品。

第三节　发酵工程的应用与展望

一、发酵工程与医药工业

（一）抗生素与维生素的发酵生产

自 1929 年英国人发现青霉菌分泌青霉素能抑制葡萄球菌生长以后，相继发现了链霉素、氯霉素等。在近几十年内，抗生素的研究又有了飞速的发展，已找到的抗生素有数千种，其中具有临床效果并已利用发酵法大量生产和广泛应用的多达百余种，现在利用发酵技术生产的“抗生素”可以把微生物代谢产生的对人类疾病的预防和治疗有用的物质都包括进去。

维生素作为六大生命要素之一，维生素 A 的前体 β-胡萝卜素及维生素 C 和维生素 E 均为抗氧化剂，能保护人体组织的过氧化损伤并提高机体免疫力，有抗癌、抗心血管疾病和白内障等功能，为整个生命活动所必需。据研究，有许多微生物具有合成维生素的能力，如三孢布拉霉，黏红酵母、布拉克须霉、丛霉等真菌具有生产 β-胡萝卜素的能力。国内外已经通过发酵的方法用真菌三孢布

拉霉生产β-胡萝卜素。

维生素C的微生物发酵法早已取得重要突破，进入产业化。目前利用氧化葡萄糖杆菌与一种蜡状芽孢杆菌混合菌共固定化发酵技术，可将维生素C的收率提高到80%以上，生产周期比传统工艺缩短1/3。

（二）医用酶制剂的发酵生产

心脑血管疾病是危害人类健康的主要杀手。目前，有效的尿激酶、蚓激酶等源于动物体内的溶血栓药物已进入临床实用。来源于微生物的溶栓类药物也得到开发。与动物来源的该类药物相比，微生物生产的溶栓酶存在其优越性：只要有高产菌种，生产工艺条件确定以及产品的有效性或高效性，即可实现规模生产。最近，我国科学家分离到一种根霉，能生产血栓溶解酶，溶血栓活性高，专一性强，对血细胞无分解作用，而且低毒、价廉，可以通过发酵进行大量生产。

（三）紫杉醇的微生物合成

紫杉醇主要是由红豆杉属树种产生的一种二萜类抗癌新药，对卵巢癌、乳腺癌及黑素瘤等有突出疗效，是近15年来发现的最重要的抗癌药物。但临床上用的紫杉醇是从天然红豆杉树皮中提取出来的，其含量占树皮干重的万分之二。现在红豆杉树资源已经严重缺乏，因此，采用微生物产生发酵是开辟紫杉醇新来源的途径之一。1993年Stierle等首次报道了通过发酵真菌安德烈紫杉菌能产生紫杉醇。最近，他们又分离到1株小孢盘多毛孢菌，其发酵水平略高。美国华盛顿大学研究人员运用生物工程技术，将紫杉醇合成酶基因转入紫杉醇产生菌中，有可能建构高产紫杉醇的“工程菌”，预计此工程紫杉醇的产量比天然真菌提高几千倍。

二、发酵工程与食品工业

发酵工程在食品工业上的应用十分广泛，主要包括以下三方面。

① 生产传统的发酵产品，如啤酒、果酒、食醋等，使产品的产量和质量得到明显的提高。

② 生产各种各样的食品添加剂，改善了食品的品质及色、香、味。例如，用发酵方法制得的 L-苹果酸是国际食品界公认的安全型酸味剂，广泛用于果酱、果汁、饮料、罐头、糖果、人造奶油等的生产中。

③ 随着人口的增长，粮食短缺已成为困扰人们的社会问题之一，而发酵工程的发展将为解决这一问题开辟新的途径。研究表明，微生物含有丰富的蛋白质，如细菌的蛋白质含量占细胞干重的60%～80%，酵母菌的占 45%～65%，而且它们的生长繁殖速度很快。因此，许多国家就利用淀粉或纤维素的水解液、制糖工业的废液、石化产品等为原料，通过发酵获得大量的微生物菌体。这种微生物菌体就叫做单细胞蛋白。20 世纪 80 年代中期，全世界生产的单细胞蛋白已达 2×10^6 t。用酵母菌等生产的单细胞蛋白可作为食品添加剂，供人们食用。最近国外市场上出现的一种真菌蛋白食品，就以其高蛋白、低脂肪的特点受到了消费者的欢迎。单细胞蛋白用作饲料，能使家畜、家禽增重快，产奶或产蛋量显著提高。

第九章　现代分子生物学技术

第一节　PCR 技术

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）是 20 世纪 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术。它具有特异、敏感、产率高、快速、简便、易自动化等突出优点，能在一个试管内将所要研究的目的基因或某一 DNA 片段在几小时内扩增至成千上万倍。过去几天几星期才能完成的事情，用 PCR 几小时便可完成。

一、PCR 技术的原理及应用

（一）PCR 技术的原理

PCR 技术的原理类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 反应基本上包括三个步骤。

1. 模板 DNA 的变性

模板 DNA 经加热至 94℃左右一定时间后，使模板 DNA 双链解离，使之成为单链，以便与引物结合，为下轮反应做准备。

2. 模板 DNA 与引物的退火（复性）

模板 DNA 经加热变性成单链后，当温度降至 55℃左右时，两条单链 DNA 开始重新复性，同时引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合。

3. 引物的延伸

DNA 模板-引物结合物在 *Taq*DNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶 DNA 为模板，按碱基配对原则，合成一条新的与模板 DNA 链互补的复制链。

重复循环变性→退火→延伸过程，就可获得更多的 DNA，而且这种新 DNA 链又可成为下次循环的模板。2～3 小时就能将待扩

目的基因扩增放大几百万倍。

（二）PCR 技术的应用

1. 目的基因获得

PCR 技术是通过模拟体内 DNA 复制的方式，在体外有选择性地将染色体或 DNA 上某个特殊区域扩增出来的技术。将模板 DNA 置于 92～96℃，进行变性处理，使双链 DNA 在高温下解链成为两条单链；然后退火，将温度降至 37～72℃，使引物与模板的互补区相结合；最后，在 72℃条件下，DNA 聚合酶将 dNTP 连续加到引物的 3′-OH 端，合成 DNA，这个步骤称为延伸。这三个热反应过程称为一个循环，经过 20～40 个循环可扩增得到大量位于两条引物之间的目的 DNA 片段。然后经过对该片段的序列分析进行鉴定。

2. 疾病诊断

通过 PCR 技术可以方便快捷地鉴定生物样品中是否含有某种特定的 DNA 序列，从而广泛用于物种或品系的鉴定，以及临床样本的诊断，病原物的污染鉴别和法医鉴定等。最简单的莫过于设计一对引物或几对引物，加以对照，通过 PCR 扩增来检测样品中的特定 DNA 的存在。现在开发的多重技术可以同时进行多个目标的检测。

多种病原微生物的同时检测或鉴定，它是在同一 PCR 反应管中同时加上多种病原微生物的特异性引物，进行 PCR 扩增。可用于同时检测多种病原体或鉴定出是哪一型病原体感染。例如：在肝炎病毒检测时，在同一病人或同一供血者体内，有时存在多种肝炎病毒重叠感染，有时是甲乙丙型肝炎病毒重叠，有时可能是甲乙型肝炎病毒重叠，有时是乙丙型肝炎病毒重叠感染。

多重 PCR 的特点如下。①高效性：在同一 PCR 反应管内同时检出多种病原微生物，或对有多个型别的目的基因进行分型，特别是用一滴血就可检测多种病原体；②系统性：多重 PCR 很适宜于成组病原体的检测；③经济简便性：多种病原体在同一反应管内同时检出，将大大节省时间，节省试剂，节约经费开支，为临床提供

更多、更准确的诊断信息。

二、实时荧光定量 PCR 技术

PCR 可对特定核苷酸片段进行指数级的扩增。在扩增反应结束之后，我们可以通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行定性的分析，也可以通过放射性核素掺入标记后的光密度扫描来进行定量的分析。无论定性还是定量分析，分析的都是 PCR 终产物。但是在许多情况下，我们所感兴趣的是未经 PCR 信号放大之前的起始模板量。例如我们想知道某一转基因动植物转基因的拷贝数或者某一特定基因在特定组织中的表达量。在这种需求下荧光定量 PCR 技术应运而生。

（一）实时荧光定量 PCR 原理

所谓的实时荧光定量 PCR 就是通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性的分析。在实时荧光定量 PCR 反应中，引入了一种荧光化学物质，随着 PCR 反应的进行，PCR 反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线图（如图 9-1 所示）。

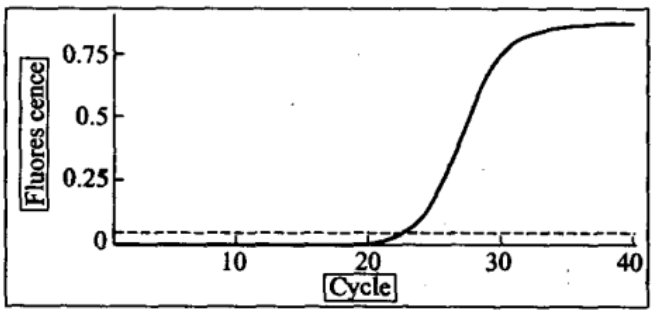

图 9-1　实时荧光扩增曲线图

一般而言，荧光扩增曲线可以分成三个阶段：荧光背景信号阶段，荧光信号指数扩增阶段和平台期。在荧光背景信号阶段，扩增的荧光信号被荧光背景信号所掩盖，我们无法判断产物量的变化。而在平台期，扩增产物已不再呈指数级的增加。PCR 的终产物量

与起始模板量之间没有线性关系，所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出起始 DNA 拷贝数。只有在荧光信号指数扩增阶段，PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系，我们可以选择在这个阶段进行定量分析。为了定量和比较的方便，在实时荧光定量 PCR 技术中引入了两个非常重要的概念：荧光阈值和 CT 值。荧光阈值是在荧光扩增曲线上人为设定的一个值，它可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上，但一般我们将荧光域值的缺省设置是 3～15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数被称为 CT 值（threshold value)(如图 9-2 所示)。

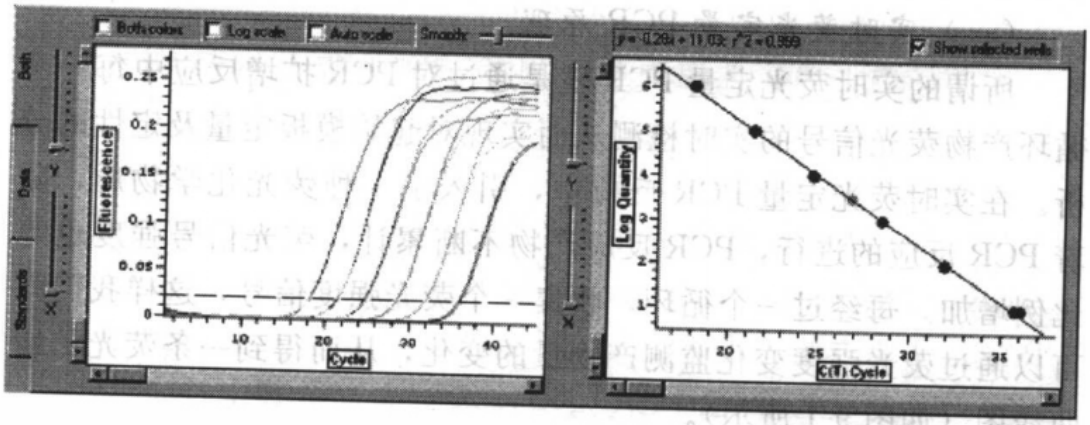

图 9-2　荧光定量标准曲线

CT 值与起始模板的关系研究表明，每个模板的 CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，CT 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，其中横坐标代表起始拷贝数的对数，纵坐标代表 CT 值。因此，只要获得未知样品的 CT 值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

（二）实时荧光定量 PCR 的应用

实时荧光定量 PCR 的应用范围比较广泛，主要有以下几个方面。

1. 病原体测定

利用 PCR 技术可以对疾病、病原体进行快速检测。但由于 PCR 反应本身的特性，在临床应用过程中受到一定的限制。

一些研究资料表明，病原体感染后的发病时间，病情轻重及预后往往与病原体数量相关。如 HIV 感染后，潜伏期长短、临床症状轻重与血液中病毒量显著相关。另据研究表明，病毒的数量与某些药物的疗效相关。例如，干扰素对肝炎病毒高拷贝者不敏感，对低拷贝者敏感。因此利用实时荧光定量 PCR 可以对某些病毒进行定量分析，用来指导临床用药和制定治疗方案。

2. 肿瘤研究

虽然肿瘤发病的机理尚未完全明了，但普遍认为肿瘤的发生与相关基因的突变、表达密切相关。实时荧光定量 PCR 不但能有效地检测基因的突变，而且能准确测定表达量，据此进行肿瘤早期诊断。甚至某些癌基因的遗传学变化的检测几乎达到确诊肿瘤的程度。例如，慢性骨髓性白血病都可检测到原癌基因易位导致的 BCR/ABL 融合基因形成。

3. 其他方面

在基因表达调控的研究中，由于实时荧光定量 PCR 的应用，对 mRNA 的检测显得较以前常用的方法，如 Nothern blot、RT-PCR 定量法要方便、快速、准确得多。

三、微卫星 DNA 的 PCR 扩增技术——亲子鉴定技术

亲子鉴定是应用医学、生物学的理论和技术，判断父母与子女之间是否存在亲缘关系的科学方法。随着科学技术的发展，亲子鉴定方法近年来也在不断发展，准确性、实用性都有所提高。

原来主要采用血型鉴定的方法。但是由于血型的多态性程度有限，许多人可表现同一血型；而且在遗传上还有显性与隐性之分，子女的血型（表型）不一定都和父母一样，所以血型检测在某些情况下只能作出排除的结论，只适于作亲子关系的初步鉴定和在输血中检测。

DNA 是人类遗传的基本载体，DNA 遗传标记通过遗传终身不变。每个人体细胞有 23 对（46 条）成对的染色体，其分别来自父亲和母亲。夫妻之间各自提供的 23 条染色体，在受精后相互配对。DNA 存在于细胞核内的染色体上，人类为维持种族的延续，必须

把他们的遗传信息（DNA）稳定地传递给下一代。由于人体约有30亿个核苷酸构成整个染色体系统，而且在生殖细胞形成前的互换和组合是随机的，所以除同卵双胞胎以外，没有任何两个人具有完全相同的核苷酸序列，这就是人的遗传多态性。尽管存在遗传多态性，但每一个人的染色体必然也只能来自其父母，这就是DNA亲子鉴定的理论基础。

微卫星DNA是一类广泛存在于真核生物基因组中的DNA串联重复序列，它由2～6bp的核心序列组成，通常重复15～60次，片段大小一般为100～300bp。微卫星DNA主要由于核心序列的重复次数不同而具有高度多态性，是生物体的个体特征，遵循孟德尔共显性遗传规律，绝大多数不受选择压力的影响，且较均匀地分布于人类全基因组。在人类基因组中约有50万个微卫星DNA序列位点。

用一定的微卫星DNA核心序列作引物，与待测样品DNA进行PCR扩增，微卫星DNA多态性便可在电泳凝胶中显现出来。近来已发展出用荧光标记微卫星DNA引物，使用几对引物在同一PCR管中进行复合扩增，用全自动DNA测序仪进行扩增的分离和检测，结果可以通过软件读取分析。将被测的结果进行比对分析，即可获得二者之间的遗传相似度，从而确定二者的遗传关系。应用微卫星DNA的PCR扩增进行亲子鉴定的技术就是在此基础上建立起来的。

微卫星DNA的PCR扩增技术有如下优点：①扩增的DNA片段短，扩增效率高，灵敏度高；②需要的模板量少，仅需1～5ng的模板DNA；③扩增结果易于分析，不需要放射性标记；④可检测部分降解或陈旧性的生物材料，尤其适于检测血痕、精液斑、唾液、毛发等材料。

由于微卫星DNA分型具有很高的灵敏度和良好的重复性，分型结果稳定可靠，被称为第二代的DNA指纹法，已被广泛应用于亲子鉴定、个体识别、医学诊断、法医检测、基因组研究、物种进化遗传以及生物考古研究中。

第二节　生物芯片技术

生物芯片（biochip）是指通过机器人自动印迹或光引导化学合成技术在硅片、玻璃、凝胶或尼龙膜上制造的生物分子微阵列，根据分子间的特异性相互作用的原理，将生命科学领域中不连续的分析过程集成于芯片表面，以实现对细胞、蛋白质、基因及其他生物组分的准确、快速、大信息量的检测。

在实际应用方面，生物芯片技术可广泛应用于疾病诊断和治疗、药物筛选、司法鉴定、环境检测等许多领域。它将为人类认识生命的起源、遗传、发育与进化，为人类疾病的诊断、治疗和防治开辟全新的途径，为生物大分子的全新设计和药物开发中先导化合物的快速筛选和药物基因组学研究提供技术支撑平台，总之，生物芯片技术在医学、生命科学、药业、农业、环境科学等领域具有重大的应用前景。

一、基因芯片

基因芯片（又称 DNA 芯片）是生物芯片的一种类型，它是将 DNA 分子固定于支持物上，并与标记的样品杂交，通过自动化仪器检测杂交信号的强度来判断样品中靶分子的数量，进而得知样品中 mRNA 的表达量，也可进行基因突变体的检测和基因序列的测定。

基因芯片主要应用在：①基因表达分析；②基因型及多态性分析；③杂交测序；④核酸和蛋白质相互作用的研究；⑤疾病的诊断与治疗；⑥药物开发；⑦在营养与食品卫生领域的应用；⑧在环境科学领域中的应用。

1. 基因表达水平的检测

用基因芯片可以自动、快速地检测出成千上万个基因的表达情况。Schena 等采用拟南芥基因组内共 45 个基因的 cDNA 微阵列（其中 14 个为完全序列，31 个为 EST），检测该植物的根、叶组织内这些基因的表达情况。通过基因芯片检测发现，该植物根和叶组织中存在 26 个基因的表达差异，而叶绿素中的 CAB1 基因在叶组

织较根组织表达高 500 倍。

2. 基因诊断

通过比较从正常人和病人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交结果，分析这两种图谱，就可以得出病变的 DNA 信息。这种基因芯片诊断技术以其快速、高效、自动化等特点，将成为一项现代化诊断新技术。

3. 药物筛选

如何分离和鉴定药的有效成分是目前中药产业和传统的西药开发遇到的重大难题，基因芯片技术是解决这一问题的有效手段。可以利用基因芯片分析用药前后机体的不同组织、器官基因表达的差异，它能够大规模地筛选、通用性强，能够从基因水平解释药物的作用机理，具有很大的潜在应用价值。

二、蛋白质芯片

DNA 芯片技术主要被应用于对生物样品中的各种已知或未知的核酸序列表达的检测和比较研究，对作为生物体细胞中实施化学反应功能成分的蛋白质，未能显示出直接的关系。为了进一步揭示细胞内各种代谢过程与蛋白质之间的关系以及某些疾病发生的分子机理，必须对蛋白质的功能进行更深入的研究。随着 DNA 芯片技术的不断成熟，蛋白芯片技术也就应运而生。

1. 蛋白芯片技术的基本原理

蛋白芯片技术的基本原理是将各种蛋白质有序地固定于滴定板、滤膜和载玻片等各种载体上成为检测用的芯片，然后，用标记了特定荧光物质的蛋白质或其他成分与芯片作用，再利用荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术，测定芯片上各点的荧光强度，通过荧光强度分析蛋白质与蛋白质之间相互作用的关系，由此实现测定各种蛋白质功能的目的。

2. 蛋白芯片的应用

目前，学者们正在开展有关蛋白芯片技术应用的研究，根据蛋白芯片技术的基本原理，可以将不同的抗体固定于载体上成为抗体蛋白芯片，用于检测不同组织产生的蛋白质。

Holt 等利用蛋白芯片技术筛选能够相互结合的特异抗体抗原成分，他们利用 12 种表达较强但尚未接触任何抗原的抗体片段筛选含有 27648 种人胎脑蛋白的蛋白芯片，从中找出了 4 组高度特异性的抗原（蛋白）-抗体复合物，其中有 3 种抗体结合的蛋白质功能未明，但是由于表达水平都较低，说明这种抗原-抗体的结合技术是一种具有较高特异性和敏感性的筛选方法，可以用于高通量筛选分离各种不同的抗体成分，或检测基因的表达和蛋白分子间的相互作用，这将有助于对某些疾病（包括肿瘤）的发病分子机理的研究，以及协助寻找疾病诊断和治疗的靶分子。

第三节　RNA 干涉技术

基因沉默是生物体内特定基因由于种种原因不表达的遗传现象。RNA 干涉是指短的 dsRNA 可以降解内源的同源 RNA，而使相应基因沉默的现象，简称 RNAi。RNA 干涉（RNAi）技术是利用一些小的双链 RNA 来高效、特异地阻断体内特定基因的表达，并促使 mRNA 降解，从而诱使细胞表现出特定基因缺失的表型。

现在，RNAi 技术在机制和应用方面均有了惊人的进步，RNAi 或相关的研究内容在 2000～2003 年，连续 4 年列入十大科技进步之一。无论在基础研究领域，还是在医学应用领域，RNAi 都是一种不可多得的有力工具。

一、RNAi 的发现

1995 年，康乃尔大学的 Su Guo 在利用反义 RNA 技术特异性地抑制秀丽新小杆线虫中的 par-1 基因的表达时，意外发现对照实验中给线虫注射正义 RNA 也能抑制 par-1 基因的表达。1998 年 2 月，Andrew Fire 和 Craig Mello 证实 Su Guo 遇到的正义 RNA 抑制基因表达的现象，是由于体外转录所得 RNA 中污染了微量双链 RNA 而引起的。当他们将体外转录得到的单链 RNA 纯化后注射线虫，基因抑制效应变得十分微弱，而经过纯化的双链 RNA 却正好相反，能够高效特异性阻断相应基因的表达，将这一现象称为 RNA 干涉（RNA interference，简称 RNAi）。

二、RNAi 的作用机制

目前，对 RNAi 机制的理解主要是来自线虫与植物的遗传学分析和果蝇提取物的生化研究。随着研究的不断深入，关于 RNAi 的作用机制和途径的描述越来越清晰。

通过对果蝇胚胎提取物和 S2 细胞的生化分析提出的 RNAi 作用机制模型将 RNAi 过程分为四个步骤。RNAi 的起始是在 Dicer 酶的作用下，将 dsRNA 剪切成 21～25 个核苷酸的短双链 siRNA，此步骤需要 ATP 提供能量；随后这些 siRNA 被组装成无活性的蛋白复合体 RISC，每个 RISC 仅含有一个 siRNA 和一个剪切核酸的蛋白；然后 siRNA 解链将无活性的复合体转变成活性形式；最后，在无需或少量 ATP 的帮助下，该复合体以 siRNA 为指导，以靶 RNA 为模板，类似 PCR 扩增形成 dsRNA，然后由 Dicer 识别并切割互补的靶 RNA，形成新的 siRNA，进入下一步的反应。

三、RNAi 的操作步骤

1. siRNA

通过化学合成或体外转录的方法得到约 21 个核苷酸的两段小 RNA，经退火后形成约 19 个碱基互补，两边 3′端各有 2 个碱基突出的 siRNA。目前此类 siRNA 应用最广泛。尤其是经过修饰后提高稳定性的 siRNA 仍可表现特异的基因沉默作用，为其在体内的应用提供了可能的前景。

2. 构建 RNAi 载体

由于在哺乳动物和果蝇中不存在 RNAi 的扩增机制，导入以上 RNA 产生的 RNAi 作用不可避免地具有瞬时性。为了克服这个弱点，一些研究小组发展了基于 DNA 载体在体内表达 siRNA 的技术。这种载体可以是质粒，也可以是病毒，甚至可以是 DNA 片段。

目前主要应用的是 U6 启动子和 H1 启动子，一方面它们在体内有较高的转录效率，另一方面以数个连续 T 为终止信号，限制了 RNA 的大小从而不引起干扰素的非特异作用。此种表达系统还可分成三类：一是基于发夹 RNA 的基因沉默效应而设计的表达发

夹 RNA 的质粒载体；二是在载体上构建两个启动子分别表达 siRNA 的正义 RNA 和反义 RNA；三是共同导入分别表达 siRNA 的互补片段的含有 U6 或 H1 启动子的 DNA 片段，或者表达发夹 RNA 的 DNA 片段。

3. 利用脂质体等试剂将获得的 siRNA 或 RNAi 载体导入受体生物内。

四、RNAi 的应用

目前普遍认为生物中自然存在 RNAi 的作用是在动植物中作为生物体内一种免疫系统，有效防止外源有害基因如病毒的侵入，也是基因表达调控的一个重要途径。RNAi 不但具有十分重要的生物学意义，在生命科学研究中也具有极其广泛的应用前景。

1. 功能基因组的研究

在功能基因组研究中，需要对特定基因进行沉默或敲除，以确定其功能。由于 RNAi 具有高度的序列专一性，可以特异地使特定基因沉默，获得功能丧失或降低的突变体，因此 RNAi 可以作为一种强有力的研究工具，用于功能基因组的研究。

2. 疾病治疗

RNAi 可以直接用于疾病相关基因的抑制，从而达到疾病治疗或预防的目的。例如在抗肿瘤治疗中，RNAi 可用于抑制癌基因的表达；也可用于抑制基因扩增或抑制融合基因表达；还可用于抑制其他与肿瘤发生发展相关基因的表达。

3. 在其他基础研究领域

例如在信号传递途径中，根据 RNAi 产生的功能丧失表型，可以很容易地从某一信号传递途径被打断的所有表型中鉴定出被降解的 mRNA，从而鉴定出参与了信号传递通路的信号分子；还有可能通过打靶某一信号分子 mRNA 明辨其与其他信号分子在传递通路中的关系。

五、RNAi 技术的展望

尽管 RNAi 技术飞速发展，但在许多方面还存在着问题。在基础研究应用方面，因为不完全互补的 siRNA 也可能抑制基因的表达，

虽然其机制和相关的 RNA 序列要求仍未知，但有可能对 RNAi 的特异性提出挑战，RNAi 不能完全区别出仅有几个碱基的突变。

在应用研究领域，最主要的问题是转运系统的选择，如何找到一种高效而低毒的用于人体的转运载体是摆在所有 RNAi 应用面前的最大敌人。

总之，随着 RNAi 研究的进一步深入，对 RNAi 机制的进一步理解，以及解决应用方面的限制因素，RNAi 将是基因功能研究和疾病基因治疗的革命性工具。

第四节　DNA 疫苗

免疫淋巴细胞是哺乳动物体内的免疫系统的重要组成部分，这类细胞种类繁多，大体上可分为 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。当机体遭到病源入侵后，B 细胞就会辨认病源的表面抗原蛋白，如果确认该病源为外来入侵者，B 细胞就会分化出很多相同的细胞，一起释放出抗体以中和阻止病源的活性。T 细胞专门消灭活病源入侵者，例如细菌和病毒。

由于人类免疫系统是具有记忆性的，科学家利用此特性，将一些病原微生物灭活后制成传统疫苗注入人体，刺激免疫系统产生防卫反应。因为灭活的病原微生物不能进入人体，于是只有 B 细胞产生免疫应答，而杀手 T 细胞不会有任何反应。传统疫苗的效力会随着时间的增加而减弱。此外也有一些传统疫苗是利用弱病毒制成的，在引发体液和细胞免疫反应同时，这些病原进入体内仍有活性化的可能。

DNA 疫苗和传统疫苗不同，它是将致病物质的 DNA 片段，以遗传基因工程技术处理，连接到表达载体，用皮下注射，或基因枪等方法将其送进体内，使 DNA 片段在体内进行表达，产生抗原蛋白。这些蛋白进入体内，就会使免疫系统中的 B 细胞和 T 细胞同时反应，状况类似一般病毒进入体内一样。

一、DNA 疫苗的特点

DNA 疫苗与常规疫苗相比，具有如下优点。

① DNA 疫苗易于设计、构建、建造，且成本低廉，适于规模化生产。

② 化学性质稳定，不怕高温，具有良好的耐热性，便于保存和运输。

③ DNA 疫苗通过宿主细胞表达目的的蛋白抗原，这种蛋白质与原核生物表达系统中产生的蛋白相比，更接近于天然蛋白抗原分子，不仅可以诱导体液免疫，还可诱导细胞免疫，使机体产生比使用其他常规疫苗更有效的免疫应答。

④ DNA 疫苗在体内的表达是持久的，因此单一剂量的 DNA 疫苗可激发长时间的免疫。

⑤ DNA 疫苗只有编码所需抗原的基因被导入细胞中表达，载体本身没有免疫原性，相对安全。

二、DNA 疫苗的免疫机制

关于 DNA 疫苗的免疫机制目前尚不十分清楚，但根据现有资料来看主要有以下三点。

① DNA 疫苗接种后，被结合在游离核糖体上的 mRNA 翻译而表达，合成的内源性抗原蛋白其中一部分以行之有效的比例结合到泛肽上，进一步结合泛肽，结合多个泛肽的蛋白，呈递到蛋白酶，降解为多肽，通过抗原肽转运结构（TAP）运送到内质网腔，与 MHC-Ⅰ类分子以亲和吸附方式形成聚合体，多肽-MHC-Ⅰ类分子聚合体通过内质网进入高尔基体，最终到达细胞膜的表面，诱发 CD8＋细胞毒性 T 细胞应答的产生。

② 另一部分蛋白抗原从分泌它们的抗原递呈细胞（APC）的细胞膜上进入 MHC-Ⅱ类型途径，进入 MHC-Ⅱ类呈递途径的蛋白在溶酶体中水解，产生大约 20～25 个氨基酸的多肽，这些溶酶体包含 MHC-Ⅱ分子的囊泡融合，MHC-Ⅱ分子结合合适的多肽形成 MHC 异聚体，成熟的 MHC 异聚体在细胞膜表面和 CD4＋T 细胞反应，引发体液免疫应答。

③ 也有一部分抗原多肽递呈给 B 细胞，使 B 细胞自身活化，产生特异性抗体，诱发体液免疫。另外递呈后的 CD+限制性 T 细

胞（Th）活化、增殖可产生多种细胞因子，进一步促进和强化体液免疫和细胞免疫。

三、DNA 疫苗的接种途径

据报道，已有许多递送外源基因到哺乳动物组织或器官内的方法获得不同程度的成功。这些方法有：重组逆转录病毒载体活体内感染、微弹轰击法或基因枪法、脂质体包裹法、与特异性蛋白载体结合的 DNA 递送法、黏膜组织免疫法等。另外近年来也有人研究用鼻内点滴或鼻腔喷雾的方式递送 DNA 疫苗。以上方法中微弹轰击法是现已证实的诱发机体保护性免疫的最有效的 DNA 免疫接种方法。

四、存在问题

有效目的基因的选择问题、应用对象问题、安全性问题、免疫耐受性问题、抗原进入机体后表达难以调控问题、婴儿免疫后因代谢太快而无法持续表达问题和污染问题等，这些都是 DNA 疫苗发展尚待解决的问题。

第五节　酶联免疫技术

酶联免疫技术（ELISA）是在免疫酶技术的基础上发展起来的一种新型的免疫测定技术。

一、酶联免疫技术原理

酶联免疫技术是利用抗原抗体反应进行的检测方法，即应用制备好的特异性抗原或抗体作为试剂，以检测标本中的相应抗体或抗原。它的特点是具有高度的特异性和敏感性。

酶联免疫共分四个步骤：①使抗原或抗体结合到某种固相支持物表面；②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体，在测定时，把受检标本（测定其中的抗体或抗原）和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相支持物表面的抗原或抗体起反应；③用洗涤的方法使固相支持物上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开；④加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，根据颜色反应的深浅进行定性或定量分析。

二、酶联免疫类型和操作步骤

ELISA 可用于测定抗原，也可用于测定抗体。根据不同的实验目的，可采用不同类型的检测方法。最常用的有夹心法、间接法测抗体、竞争法等几种。

（一）夹心法

夹心法是利用双抗体检测抗原最常用的方法，操作步骤如下。

① 将特异性抗体与固相支持物连接，形成固相抗体，洗涤除去未结合的抗体及杂质。

② 加受检标本，使之与固相抗体接触反应一段时间，让样品中的抗原与固相支持物上的抗体结合，形成固相抗原复合物。洗涤除去其他未结合的物质。

③ 加酶标二抗，使固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合。彻底洗涤未结合的酶标抗体。

④ 加底物，酶催化底物成为有色产物。根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量。

同样，也可将大分子抗原分别制备固相抗原和酶标抗原结合物，即可用双抗原夹心法测定标本中的抗体。

（二）间接法测抗体

间接法的原理为利用酶标记的抗-抗体检测已与固相结合的受检抗体，故称为间接法。操作步骤如下。

① 将特异性抗原与固相支持物连接，形成固相抗原。洗涤除去未结合的抗原及杂质。

② 加稀释的受检样品，其中的特异抗体与抗原结合，形成固相抗原抗体复合物。经洗涤后，固相支持物上只留下特异性抗体。其他免疫球蛋白及血清中的杂质由于不能与固相抗原结合，在洗涤过程中被洗去。

③ 加酶标抗抗体，与固相复合物中的抗体结合，从而使该抗体间接地标记上酶。洗涤后，固相支持物上的酶量就代表特异性抗体的量。

④ 加底物显色，颜色深度代表标本中受检抗体的量。

（三）竞争法

竞争法可用于测定抗原，也可用于测定抗体。以测定抗原为例，受检抗原和酶标抗原竞争与相同的抗体结合，因此结合于固相的酶标抗原量与受检抗原的量呈反比。操作步骤如下。

① 将特异抗体与固相支持物连接，形成固相抗体。洗涤。

② 待测管中加受检标本和一定量酶标抗原的混合溶液，使之与固相抗体反应。如受检标本中无抗原，则酶标抗原能顺利地与固相抗体结合。如受检标本中含有抗原，则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合，竞争性地占去了酶标抗原与固相支持物结合的机会，使酶标抗原与固相支持物的结合量减少。参考管中只加酶标抗原，保温后，酶标抗原与固相抗体的结合可达最充分的量。洗涤。

③ 加底物显色：参考管中由于结合的酶标抗原最多，故颜色最深，参考管颜色深度与待测管颜色深度之差，代表受检标本抗原的量。待测管颜色越淡，表于标本中抗原含量越多。

三、酶联免疫技术的应用

ELISA 应用的范围非常广泛，理论上 ELISA 可用于检测一切抗原、抗体及半抗原。在实际应用方面可作疾病的临床诊断、疾病监测及农业上的植物病害的诊断检定等。

① 临床诊断：在内分泌方面已经用于检测雌性激素、绒毛膜促性腺激素、黄体素、胰岛素、皮质醇、促甲状腺素和孕酮等，在血液学方面可用于检查凝固因子、红细胞抗原及结合球蛋白等，在肿瘤方面已试用检查甲胎蛋白，在传染病的诊断方面的应用正在日益扩大。

② 疾病监测：用于检查霍乱弧菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和破伤风梭菌毒素、脑膜炎球菌及淋球菌等病原微生物。

③ 在卫生学方面，可用于检测食品中葡萄球菌肠毒素及沙门菌毒素等，还可用于植物组织浆液中检查植物病毒。

第十章　生命科学与社会发展

生命科学发展到今天，学科的界限逐渐融合，与其他领域如物理、信息、材料、环境和能源等多学科之间相互交叉和相互渗透，形成了许多交叉学科，下面进行简单介绍。

第一节　生物能源

2005年8月31日这一天，纽约期货交易所西得克萨斯轻质原油期货价格创出了每桶70.85美元的历史纪录，这次国际油价涨幅之高、高位震荡的时间持续之长，为20世纪70年代两次石油危机以来所罕见。

我国面临的形势更为严峻。中国是石油资源相对贫乏的国家，专家测算，石油稳定供给不会超过20年。有关专家预计，近期我国石油进口依存度将会超过50%。到2010年，我国石油消费总量将达4亿吨，而国内生产能力仅为1.6亿吨。

但是，化石能源的使用不是无限的。大自然经过上亿年的漫长历程积累下来的化石能源，在200年的工业文明的强力挖掘下，很快将面临着枯竭。人类的文明进步和社会生产力的发展使得人类对能源的需求越来越大，而严峻的能源形势日益成为全世界关注的焦点。经科学测算，地球上亿万年积累的化石能源（石油、天然气、煤等），仅能支撑300年的大规模开采。人们终于认识到，未雨绸缪，利用现代科技发展生物能源，是解决未来能源问题的一条重要出路。

传统的加工工业是以化石资源为原料和能源进行的，面对化石资源日益枯竭的窘境，世界正孕育着一场用生物可再生资源代替化石资源的资源战略大转移。

一、生物能源的概念

生物能源（又称绿色能源）是指从生物质得到的能源，它是人

类最早利用的能源。古人钻木取火、伐薪烧炭，实际上就是在使用生物能源。

生物能源是从太阳能转化而来的，其转化的过程是通过绿色植物的光合作用将二氧化碳和水合成生物质，生物能的使用过程又生成二氧化碳和水，形成一个物质的循环。

今天人们所用的石油、煤炭等，都是由树木、植物等腐败变成的，完成由生物体到化石能源这一过程，大自然用了上亿年的时间。

生物能源是一种可再生的清洁能源，开发和使用生物能源，符合可持续的科学发展观和循环经济的理念。因此，利用高新技术手段开发生物能源，已成为当今世界发达国家能源战略的重要内容。

当前生物能源的主要形式有沼气、生物制氢、生物柴油和燃料乙醇。

二、生物能源材料的种类

生物能源是从太阳能转化而来的，其转化的过程是通过绿色植物的光合作用将二氧化碳和水合成生物质。据估计，植物每年储存的能量约相当于世界主要燃料消耗的 10 倍；而作为能源的利用量还不到其总量的 1%。这些未加以利用的生物质，为完成自然界的碳循环，其绝大部分由自然腐解将能量和碳素释放，回到自然界中。目前对生物能源材料的利用和开发主要集中在以下几种。

1. 油料植物

地球上存在着许多油料植物，主要集中在夹竹桃科、大戟科、菊科以及豆科等，像我们熟知的油菜、蓖麻、小桐子、大豆、花生等。科学家们还发现 300 多种灌木、400 多种花卉都含有一定比例的油脂。

英国、美国等发达国家正在对已发现的 40 多种“石油植物”进行品种选育和品质优化工作，并准备尽快实现商业化生产。法国、日本、巴西、俄罗斯等国也正在开展油料植物的研究和应用。

2. 森林

森林能源是森林生长和林业生产过程提供的生物质能源，主要

是薪材，也包括森林工业的一些残留物等。薪材来源于树木生长过程中修剪的枝杈，木材加工的边角余料，以及专门提供薪材的薪炭林。

3. 农作物秸秆

农作物秸秆是农业生产的副产品，含有大量的纤维素，通过水解纤维素，可以产生能源类物质。秸秆资源与农业种植业生产关系十分密切。

4. 禽畜粪便、生活垃圾

禽畜粪便也是一种重要的生物质能源。除在牧区有少量的直接燃烧外，禽畜粪便主要是作为沼气的发酵原料。城镇生活垃圾主要是由居民生活垃圾，商业、服务业垃圾和少量建筑垃圾等废弃物所构成的混合物，成分比较复杂，其构成主要受居民生活水平、能源结构、城市建设、绿化面积以及季节变化的影响。

三、生物质能技术的发展状况

（一）国外生物质能技术的发展状况

生物质能源的开发利用早已引起世界各国政府和科学家的关注。有许多国家都制定了相应的开发研究计划，如日本的阳光计划、印度的绿色能源工程、美国的能源农场和巴西的酒精能源计划等发展计划。其他诸如丹麦、荷兰、德国、法国、加拿大、芬兰等国，多年来一直在进行各自的研究与开发，并形成了各具特色的生物质能源研究与开发体系，拥有各自的技术优势。

1. 沼气技术

通过厌氧法处理禽畜粪便和高浓度有机废水，是发展较早的生物质能利用技术。目前，日本、丹麦、荷兰、美国等发达国家均普遍采取厌氧法处理禽畜粪便，而像印度、菲律宾、泰国等发展中国家也建设了大中型沼气工程，采用新的自循环厌氧技术处理禽畜粪便的应用示范工程。

2. 生物质热裂解气化

早在 20 世纪 70 年代，在美国、日本等一些发达国家就开始了生物质热裂解气化技术研究与开发工作，到 80 年代，美国就有 19

家公司和研究机构从事生物质热裂解气化技术的研究与开发；加拿大12个大学的实验室在开展生物质热裂解气化技术的研究；此外，菲律宾、马来西亚、印度、印度尼西亚等发展中国家也先后开展了这方面的研究。

3. 生物质液体燃料

有机液体燃料，包括乙醇、植物油等，可以作为清洁燃料直接代替汽油等石油燃料。巴西是乙醇燃料开发应用最有特色的国家，20世纪70年代中期，为了摆脱对进口石油的过度依赖，实施了世界上规模最大的乙醇开发计划，到1991年，乙醇产量达到130亿升，在980万辆汽车中，近400万辆为纯乙醇汽车，其余大部分燃用20%的乙醇-汽油混合燃料，也就是说乙醇燃料已占汽车燃料消费量的50%以上。

生物质能源是人类利用最早、最多、最直接的能源，至今，世界上仍有15亿以上的人口以生物质作为生活能源。生物质燃烧是传统的利用方式，不仅热效率低下，而且劳动强度大，污染严重。通过生物质能转换技术可以高效地利用生物质能源，生产各种清洁燃料，替代煤炭、石油和天然气等燃料，生产电力。减少对矿物能源的依赖，保护国家能源资源，减轻能源消费给环境造成的污染。专家认为，生物质能源将成为未来持续能源重要部分，到2015年，全球总能耗将有40%来自生物质能源。

（二）国内生物质能技术发展现状

我国政府及有关部门对生物质能源利用极为重视，已连续在三个国家五年计划中将生物质能技术的研究与应用列为重点研究项目，涌现出一大批优秀的科研成果和成功的应用范例，如产用沼气池、禽畜粪便沼气技术、生物质气化发电和集中供气、生物压块燃料等，取得了可观的社会效益和经济效益。

① 沼气技术是我国发展最早、曾普遍推广的生物质能源利用技术。在最近的连续三个五年计划中，国家都将发展新的沼气技术列为重点科技攻关项目，计划实施了一大批沼气及其利用的研究项目和示范工程，主要用于处理禽畜粪便和有机废水。这些工程都取

得了一定程度的环境效益和社会效益，对发展当地经济和我国厌氧技术起到了积极作用。

②“八五”期间，我国开始了利用纤维素废弃物制取乙醇燃料技术的探索与研究，主要研究纤维素废弃物的稀酸水解及其发酵技术，并在“九五”期间进入中间试验阶段。我国已对植物油和生物质裂解油等代用燃料进行了初步研究，如植物油理化特性、酯化改性工艺和柴油机燃烧性能等方面进行了初步试验研究。“九五”期间，开展了野生油料植物分类调查及育种基地的建设。我国的生物质液化也有一定研究，但技术比较落后，主要开展高压液化和热解液化方面的研究。

③ 我国早期的生物质利用主要集中在沼气利用上，近年逐渐重视热解气化技术的开发应用，也取得了一定突破，但其他技术开展却非常缓慢，包括生产酒精、热解液化、直接燃烧的工业技术和速生林的培育等，都没有突破性的进展。

四、发展方向

我国的生物质能资源丰富，价格便宜，而经济环境和发展水平对生物质技术的发展处于比较有利的阶段。根据这些特点，我国生物质的发展既要学习国外先进经验，又要强调自己的特色，所以，今后的发展方向应朝着以下几方面。

① 进一步充分发挥生物质能作为农村补充能源的作用，为农村提供清洁的能源，改善农村生活环境及提高人民生活条件。这包括沼气利用、秸秆供气和小型气化发电等实用技术。

② 加强生物质工业化应用，提高生物质能利用的比重，提高生物质能在能源领域的地位。这样才能从根本上扩大生物质能的影响，为生物质能今后的大规模应用创造条件，也是今后生物质能能否成为重要的替代能源的关键。

③ 研究生物质向高品位能源产品转化的技术，提高生物质能的利用价值。这是重要的技术储备，是未来多途径利用生物质的基础，也是今后提高生物质能作用和地位的关键。

④ 同时，利用山地、荒地和沙漠，发展新的生物质能资源，

研究、培育、开发速生、高产的植物品种，在目前条件允许的地区发展能源农场、林场，建立生物质能源基地，提供规模化的木质或植物油等能源资源。

生物质能源在未来世纪将成为可持续能源重要部分。我国幅员辽阔，但化石能源资源有限，生物质资源丰富，发展生物质能源具有重要的战略意义和现实意义。采用高新技术将秸秆、禽畜粪便和有机废水等生物质转化为高品位能源，开发生物质能源将涉及农村发展、能源开发、环境保护、资源保护、国家安全和生态平衡等诸多利益，希望得到社会各界、各级政府、专家学者的广泛关注与支持，为我国的生物质能源事业创造有益的发展环境。

第二节　生物材料

在生物学研究飞速发展的过程中，不断地与各种医用材料相融合，形成了一个新的学科-生物材料学，这个学科在生物医学和工程学中得到了广泛的应用。生物材料包括三部分，即医用生物材料，仿生材料和生物模拟材料。医用生物材料最重要的是材料与人体相容性和材料本身的性能，通过组织工程、生长因子、DNA 和自组装技术，可生产出人类的各种器官。事实上，除神经系统以外，人的各种器官都可制造。仿生材料生物是多年演化的结果，生物界有很多特性值得模仿，通过深入研究现有生物体和生物现象而进行仿造，对材料的发展将起到推动作用。工业生产中的生物模拟主要是高效催化剂的探索与光合作用的模拟，因为酶催化的效率和速度千百万倍于工业催化剂，而后者的成功实现将使 CO_2 和水成为碳水化合物，粮食问题可得到解决，过剩的 CO_2 也有了出路。目前细菌冶金已实现处理低品位铜、铀矿石、尾矿，并大幅度降低污染，这将是 21 世纪解决金属矿日趋枯竭的有效途径。

一、仿生材料

（一）组织工程中的纳米生物材料

材料支架在组织工程中起重要作用，因为贴壁依赖型细胞只有在材料上黏附后，才能生长和分化。模仿天然的细胞外基质——胶

原的结构，制成的含纳米纤维的生物可降解材料已开始应用于组织工程的体外及动物实验，并将具良好的应用前景。

（二）人工蛛丝

蛛丝是自然界最奇特的物质之一，它具有极强的韧度，其韧度是同样直径钢材的好几倍。但与家蚕不同，蜘蛛不能家养，因为它们会互相吞食，所以不可能建立人工饲养蜘蛛的农场。30 多年来，科学家们一直试图找到利用其他生物体来制造蛛丝的办法。

慕尼黑理工大学生物化学家托马斯·沙伊贝尔在研究中，利用基因改良过的大肠杆菌刺激昆虫细胞，使其产生分泌蛛丝所需的特定蛋白质，最终得到质量极佳的人工丝，其韧度可达天然蛛丝的 20%。

仿生材料生物是多年演化的结果，有很多特性值得模仿。珍珠壳和骨骼表面虽然都是碳酸盐构成的，而其强度和韧性却远远高于陶瓷，深入研究结果表明，它们是纳米结构的无机盐与有机物聚合体。人造丝与蚕丝结构相近，但舒服感则不相同，又是何故？因此深入研究现有生物体和生物现象而进行仿造，对材料的发展将起到推动作用。

二、生物医用材料

生物医用纺织品既属于产业用纺织品领域，又属于医疗器材范畴，它是生命科学和材料科学交叉的产物，目前已经成为各国研究的热点。生物医用材料是现代临床医学发展的重要物质基础，其产业规模虽然不大，但知识密集，产出很高，因此世界各国对此均十分重视，其发展势头十分强劲。

生物医用纺织品所用的材料，包括短纤维、单丝、复丝和机织、针织织物及复合材料，其中代表品种有甲壳质纤维、骨胶原纤维以及海藻酸纤维。

（一）甲壳质纤维

甲壳质（也称甲壳素）来自虾和蟹等节足动物的甲壳中，在天然高分子的产量仅次于纤维素。

甲壳质是一种天然多糖物质，由于其具有较好的晶状结构和较

多的氢键，因此，其溶解性能很差。由于甲壳质或甲壳胺具有良好的生物相容性和适应性，并具有消炎、止血、镇痛和促进肌体组织生长等功能，可促进伤口愈合，因此被公认为保护伤口的理想材料。具有免疫调节、抗菌、降血压、促进伤口愈合以及细胞活性化等作用。

（二）骨胶原纤维

骨胶是一种蛋白质，它在皮肤、骨骼、腱、血管、肠、眼角膜和牙齿中担负着个体保护以及保持形态的作用，是通过重新组构牛屈肌腱的骨胶原悬浮液制成的。骨胶原作为医用材料的特点在于生物适应性优良、无抗原性、生物体吸收性良好等，因此国内外正将其开发和应用于伤口保护。

（三）海藻酸纤维

海藻酸是从海藻植物中提炼的多糖物质，通过湿法纺丝制备海藻酸纤维，该纤维的缺点是断裂强度较低。

当海藻酸钙纤维用于伤口接触层时，它与伤口之间相互作用，会产生海藻酸钠、海藻酸钙凝胶。这种凝胶是亲水性的，可使氧气通过而细菌不能通过，并促进新组织的生长。

三、生物模拟材料

化学合成纤维和浆料这些高分子聚合物不能进行生物分解和降解，造成环境的污染。目前研究人员正在研究新的酶种，通过筛选具有某种功能的菌种，进行基因改性成为高性能酶剂或通过克隆、转基因的基因工程菌，制出新酶种，或根据化学生物结构和酶学原理定向合成新型酶剂等。这些新型酶剂成为仿酶，目前较成功的酶包括 PVA 分解酶、涤纶分解酶、分解锦纶寡聚物的基因工程菌、合成酶等。

人体中物质与能量转换在常温下完成，是酶催化的结果，其效率和速度千百万倍于工业催化剂。今后的任务是高效催化剂的探索与光合作用的模拟。

由于石油资源的储量有限，以及人类生存对经济可持续发展的要求，使得生物技术合成新材料成为当今新材料研究的热点。也许

生物技术的优点还不能马上被人们充分认识，它所带来的巨大变化可能还需五年甚至更长时间才能显现，但是生物高分子材料性能和环保上的优势，决定它必将得到更大的发展。在21世纪，生物技术将影响人们生活的每一个方面，生物高分子材料将在日常生活用品、服装、医用和农用等各个领域被广泛地应用。

第三节　生物信息

生物体内的基因组包含了构成和维持一个生物有机体所必备的基本信息，由细胞内进行的多种分子生物学反应负责将这些信息转化为真正的生命现象。基因组的一部分编码蛋白质和RNA，另外一部分调控这些大分子的表达。表达的蛋白质及RNA折叠成高度专一的三维结构，在体内的特定位置上实现其功能。这些过程的大量细节都是在分子生物学研究的实验室里揭示出来的，所形成的大量信息，存储于数据库中。

一、生物信息学的研究内容

生物信息学试图利用现代信息处理技术，从这些数据中提取新的生物学信息和知识，是一门将试验科学与信息科学相结合的学科。从目前生物信息学的研究情况来看，国际上公认的生物信息学的研究内容，大致包括以下几个方面：

（一）生物信息的收集、存储、管理

主要包括建立生物信息库和生物信息传输的国际联网系统；建立生物信息数据质量的评估与检测系统；生物信息的在线服务；生物信息可视化和专家系统。

（二）功能基因组相关信息分析

包括建立大规模基因表达谱分析相关的算法、软件研究，基因表达调控网络的分析研究；与基因组信息相关的核酸、蛋白质空间结构的预测和模拟分析，以及蛋白质结构与功能的预测研究。

（三）生物大分子结构模拟和药物设计

包括蛋白质空间结构模拟和分子设计；反义RNA的分子设计；具有不同功能域的复合蛋白质以及连接肽的设计；纳米生物材

料的模拟与设计；基于酶和功能蛋白质结构、细胞表面受体结构的药物设计；基于 DNA 结构的药物设计等。

（四）生物信息分析的技术与方法研究

包括发展有效的能支持大尺度作图与测序需要的软件、数据库以及若干数据库工具，诸如电子网络等远程通讯工具；改进现有的理论分析方法，如模式识别、神经网络、多序列比较等；创建一切适用于基因组信息分析的新方法、新技术；建立严格的多序列比较方法；发展用于解释基因组的信息新方法，探索 DNA 序列及其空间结构信息的新表征；发展研究基因组完整信息结构和信息网络的研究方法等；发展生物大分子空间结构模拟、电子结构模拟和药物设计的新方法与新技术。

二、应用与发展研究

收集整理与疾病相关的人类基因信息，开发基于序列信息选择表达载体、引物的技术，建立与动植物良种繁育相关的数据库以及与大分子设计和药物设计相关的数据库。

近期生物信息学将在以下几方面迅速发展：大规模基因组测序中的信息分析；新基因和新 SNPs（单核苷酸多态性）的发现与鉴定；完整的比较基因组研究；大规模基因功能表达谱的分析；生物大分子的结构模拟与药物设计。

长远任务是非编码区信息结构分析和遗传密码起源与生物进化的研究，发现人类遗传语言的根本规律，从而阐明若干生物学中的重大自然哲学问题，像生命的起源与进化等。

第四节　生物物理

生物物理学是将物理学的概念和方法用来研究生物各层次结构与功能的关系，生命活动的物理化学过程，和物质在生命活动过程中表现的物理特性的生物学分支学科，旨在阐明生物在一定的空间、时间内有关物质、能量与信息的运动规律。

一、生物物理的发展历史

1848 年杜布瓦·雷蒙德用电流表研究肌肉神经，发现了休止

电位及动作电位。

1896 年伦琴发现了 X 射线后，立即将其应用到医学实践，皮尔逊在 1899 年首次提出用物理定律的特异事例来研究生物现象的生物物理学，并列举了当时研究的血液流体动力学、神经传导的电现象、表面张力和膜电位、弹性、黏度、硬度与生物结构的关系等问题。

1910 年希尔把电技术应用于神经生物学，并显示了神经纤维传递信息的特征是一连串匀速的电脉冲，脉冲是由膜内外电位差引起的。19 世纪显微镜的应用导致细胞学说的创立，电子显微镜的发展则提供了生物超微结构的更多信息。

20 世纪 50 年代，沃森及克里克结合 Franklin 等用 X 射线衍射方法获得的能够精确反映 DNA 某些结构特征的 X 射线衍射图片的结果，提出了遗传物质 DNA 双螺旋互补的结构模型。

1943 年薛定谔在“生命是什么”一文中，用热力学和量子力学理论解释生命的本质，引进了“负熵”概念，试图从一些新的途径来说明有机体的物质结构、生命活动的维持和延续、生物的遗传与变异等问题，吸引了许多物理学家投入对生命科学的研究。威纳认为生物的控制过程，包含着信息的接收、变换、储存和处理。

二、生物物理的应用

既然生命物质是物质世界的一个组成部分，那么它既有自身的特殊运动规律，也应该遵循物质运动的共同的一般规律。这就使生物学和物理学两个领域能够得到一致和统一。

我们都知道，光合作用中叶绿素最初吸收光子只在一千万亿分之一秒瞬间完成，视觉过程和高能电离辐射最初始的能量吸收也都是瞬间完成的，如何跟踪这些能量在生物体内最初的去向和行为，从吸收到物理化学过程的出现，究竟发生了什么物理作用，这就需要既灵敏又快速的物理检测技术来实现。

蛋白质在 56℃左右开始变性，但有的蛋白质 97℃以上还具有生物活性，在 70℃以上的温泉中还能找到生物；人工培养的细胞保存在－190℃，解冻后细胞仍与正常态一样，这些生物体内水的

结构状态是怎样？如果能通过物理的方法把这些极端状态的水的结构与性质阐明，将有助于对生命规律的理解。

尽管生命是自然界的高级运动形式，也仍然是物质综合运动的表现，只是在生物体内这种运动变化既复杂又迅速，而且随着生物物质结构的复杂化，使得研究的难度愈高。但是，对生物体内物质的运动规律进行研究，不仅能进一步阐明生物的本质，更重要的是能使人们对自然界整个物质运动规律的认识达到新的高度。

第五节　生物与环境

地球上所有生命与所生活的生态环境之间密切联系，相互作用。生物要在环境中生存下去，就要不断地从外界环境中获得所需要的物质和能量。同时生物必须生活在具有一定温度、湿度的环境中。

一、发展历史

人们很早就注意到生物与环境之间的关系。达尔文在 1859 年出版的《物种起源》一书中曾描述了地球上各生物间的食物链的关系。但是真正将生物与环境的关系作为一门独立的学科加以研究的是从德国生物学家海克尔开始的，他提出了生态学的概念。他认为生态学是研究生态——生命与环境之间关系的科学，是将生物与环境联系在一起进行研究的。生态学主要研究生物体与无机环境、其他生物体、生物群体与环境之间的关系。

就像鱼儿离不开水，草木离不开太阳一样，地球上任何生物的生存都离不开环境，必须与环境相互协调。环境为生物提供了生活资源、生长条件和繁殖场所。生物在利用资源的同时，也在改变着环境，生物与环境相适应才能够平衡地发展。

二、生物与环境的关系

生物的种类很多，要求的环境也千差万别。环境条件处处不同，资源也丰瘠不一。动物最终依赖植物作为营养来源，而植物则依赖阳光、水分、肥料成分等自然资源而生长、繁殖。各种生物所要求和适应的环境是不同的，藻类、杂草、树木、鸟类、爬虫、猛

兽，它们都各自有所适应的条件。就环境而言，都包含着光、水、气候、土壤和化学多种多样的环境因子。

由于不同地区、地貌和地理条件的差异，上述的各种因子在环境中都有数量多少、程度高低、波动幅度宽窄等量的变化。对任何一种生物而言，这些环境质量的优与劣决定这些生物对其的适与不适。

在诸多因子中，往往有一种因子对某一个物种的生存或分布起到决定性的作用，这样的因子就被称做限制因子。例如，对于许多海洋生物来说，海水的含盐量（盐度）就是它们的限制因子；而对于一些热带植物来说，温度则是它们的限制因子。

任何生物都与其他物种或多或少地存在彼此既相互依赖又相互制约的关系，从而使物种之间构成了各种类型的种间关系。这些关系主要分为以下几种类型：①寄生；②竞争；③共栖；④共生；⑤掠食。两个或几个物种之间存在的某种种间关系则往往是物种进化甚至是各个物种协同进化的结果。

从地球环境的演化历程来看，生命是地球环境发展到一定水平的产物，而生命在形成和繁盛之后，又对环境的发展演化产生了极其重要的作用。生命与环境是相互影响，相互作用，共同发展进化的。

参 考 文 献

1 陈阅增主编．普通生物学．北京：高等教育出版社，1997
2 张惟杰主编．生命科学导论（公共课）．北京：高等教育出版社，1999
3 万海清主编．生命科学概论（非生物专业使用）．北京：化学工业出版社，2001
4 王福源主编．现代食品发酵技术．北京：中国轻工业出版社，1998
5 陶兴无主编．生物工程概论．北京：化学工业出版社，2005
6 张自立，彭永康编著．现代生命科学进展．北京：科学出版社，2004
7 P. M. 利迪亚德，A. 惠兰，M. W. 范杰著．免疫学．北京：科学出版社，2003
8 郭蔼光主编．基础生物化学．北京：高等教育出版社，2001
9 周爱儒主编．生物化学．北京：人民卫生出版社，2004
10 赵寿元，乔守怡．现代遗传学．北京：高等教育出版社，2001
11 余其兴，赵刚主编．人类遗传学导论．北京：高等教育出版社，2000
12 吴建平主编．简明基因工程与应用．北京：科学出版社，2005
13 王大成主编．蛋白质工程．北京：化学工业出版社，2002
14 李再资主编．生物化学工程基础．北京：化学工业出版社，2002
15 张今主编．分子酶学工程导论．北京：科学出版社，2003
16 熊宗贵主编．发酵工艺原理．北京：中国医药出版社，1995
17 莽克强主编．农业生物工程．北京：化学工业出版社，2002
18 殷丽君主编．转基因食品．北京：化学工业出版社，2002
19 方福德，杨焕明，张德昌等．分子生物学前沿技术．北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1998
20 孔繁翔，尹大强，严国安编．环境生物学．北京：高等教育出版社，2000
21 奚旦立主编．环境与可持续发展．北京：高等教育出版社，1999
22 翟中和，王喜忠，丁明孝主编．细胞生物学．北京：高等教育出版社，2000
23 刘凌云，薛绍白，柳惠图主编．细胞生物学．北京：高等教育出版社，2002
24 王昕，李建桥，吕子珍编著．饮食健康与食品文化．北京：化学工业出版社，2003
25 沈萍主编．微生物学．北京：高等教育出版社，2000
26 孙万邦主编．医学免疫学与微生物学．北京：高等教育出版社，2005
27 徐克学主编．生物数学．北京：科学出版社，1999